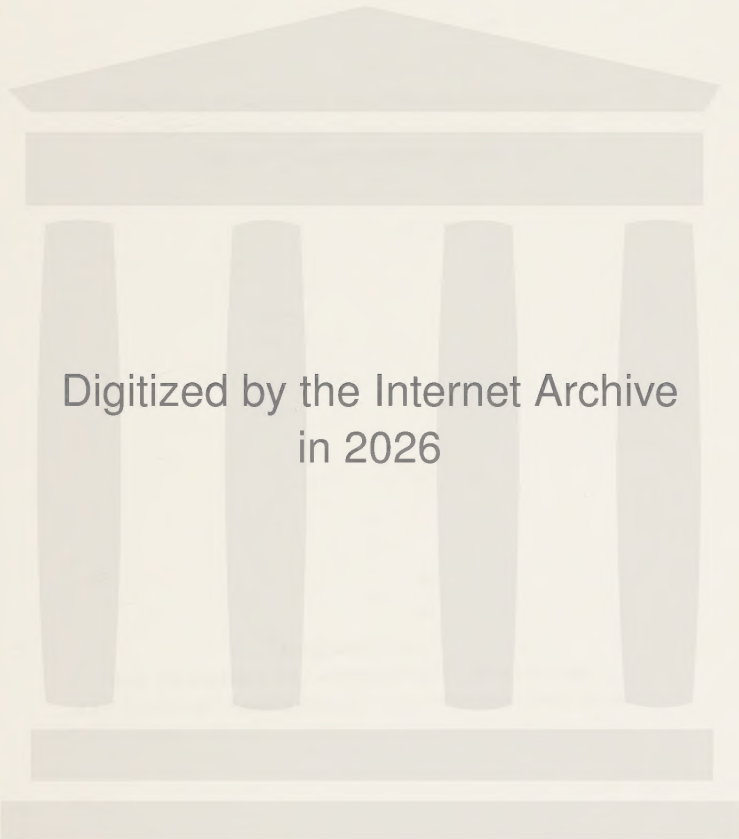


Energetik von Protonentranslokationen in Wasserstoffbrücken

Eine Untersuchung zum Mechanismus
des lichtinduzierten Protonentransports
durch Bakteriorhodopsin

Helmut Merz

*Diss
München
1985*



Digitized by the Internet Archive
in 2026

**Energetik von Protonentranslokationen
in Wasserstoffbrücken**

Eine Untersuchung zum Mechanismus des
lichtinduzierten Protonentransports
durch Bakteriorhodopsin

Dissertation
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Helmut Merz
München 1985

- 1. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Zundel**
- 2. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Ertl**

Tag der mündlichen Prüfung: 15. Juli 1985

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 1981 bis Mai 1985 am Institut für Physikalische Chemie der Universität München durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. G. Zundel,

der das Thema dieser Arbeit anregte, möchte ich für die wertvolle Anleitung und Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit und seine stete Diskussionsbereitschaft herzlich danken.

Mein Dank gilt weiter Dipl.-Phys. Ulrike Tangermann und Dr. P.P. Rastogi aus Lucknow/Indien für die großzügige Überlassung experimentellen Materials sowie Dipl.-Phys. Rainer Krämer, der durch die Produkte seines Geschicks auf dem Gebiet der Elektronik und Computerprogrammierung die Auswertung der IR-Spektren soviel einfacher gemacht hat. Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe sei Dank für das angenehme Arbeitsklima und zahlreiche anregende Diskussionen.

Die Arbeit wurde zwei Jahre von der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt.

Wissenschaften entfernen sich im ganzen immer
vom Leben und kehren nur durch einen Umweg
wieder dahin zurück.

J.W. Goethe

Inhaltsverzeichnis

1	Einführung Bioenergetik und Protonentransport; Bakteriorhodopsin	9
2	Bakteriorhodopsin Aus der Literatur bekannte Daten	
2.1	Halobakterien, Purpurmembran	15
2.2	Die molekulare Struktur	17
2.3	Die Vorgänge im Photozyklus	22
2.4	Das aktive Zentrum Die Rolle einzelner Aminosäurereste	30
2.5	Modelle und Mechanismen	37
3	Wasserstoffbrücken mit großer Protonen- polarisierbarkeit	
3.1	Wasserstoffbrückenbindung und Protonenpotential Protontransfergleichgewicht, Protonen- polarisierbarkeit, Energetik	41
3.2	Infrarotspektroskopische Eigenschaften von Wasserstoffbrücken	49
3.3	Wasserstoffbrückensysteme mit großer Protonenpolarisierbarkeit	54
3.4	Rolle von Wasserstoffbrücken mit großer Protonenpolarisierbarkeit in biologischen Systemen	56

4	Experimentelle Untersuchungen	
4.1	überblick	61
4.2	Verwendete Substanzen	64
4.3	Meßtechnik	68
4.4	Auswertung	
	Spezies, Gleichgewichte, thermodynamische Parameter	72
4.5	Phenol + Retinal-Schiffbase	77
4.6	Carbonsäure + Retinal-Schiffbase	90
4.7	Phenol + Carboxylat	104
4.8	Fehlerdiskussion	111
4.9	Zusammenfassung und Diskussion der experimentellen Ergebnisse	115
5	Zum Mechanismus der Protonenleitung	
5.1	Das Molekülmodell	119
5.2	Der Mechanismus	123
5.3	Andere Mechanismen der Protonenleitung	130
6	Interpretation, Diskussion, Schlußfolgerungen	
6.1	Feldinduzierter Protontransfer und Energieumwandlung	135
6.2	Schlußfolgerungen aus den Untersuchungen an Modellsystemen	140
6.3	Der Mechanismus der lichtinduzierten Protonentranslokation: Möglichkeiten einer Klärung	147
7	Zusammenfassung	151
	Literaturverzeichnis	153

1 Einführung

Bioenergetik und Protonentransport; Bakteriorhodopsin

Nach Mitchells *chemiosmotischer Hypothese* wird die bei den Redoxreaktionen in der Atmungskette und bei den Primärprozessen der Photosynthese freiwerdende Energie in Form eines elektrochemischen Potentials zwischengespeichert. Dieses Potential wird durch den Transport positiver Ladungen - in Form von Protonen - über die Membran, in die die jeweiligen Enzyme eingebaut sind, hinweg aufgebaut. Das so entstehende elektrochemische Membranpotential setzt sich aus einer elektrischen Komponente, die von einer ungleichen Ladungsverteilung an den beiden Membranoberflächen herrührt, und einer Konzentrationskomponente, die durch die unterschiedliche Protonenkonzentration - d. h. einen unterschiedlichen pH-Wert - zu beiden Seiten der Membran bedingt ist, zusammen [1].

Die in dieser Weise zwischengespeicherte freie Enthalpie kann von den verschiedensten energieverbrauchenden Prozessen genutzt werden [2]; von besonderem Interesse ist dabei die Synthese von Adenosintriphosphat (ATP) aus Adenosindiphosphat (ADP) und anorganischem Phosphat (P_i), die von dem membran- gebundenen Enzym ATPase (auch: ATP-Synthase) katalysiert wird. Bei dieser Reaktion fließen Protonen passiv - vom erwähnten elektrochemischen Membranpotential, der sog. "proton motive force" [1], getrieben - durch den die Membran durchdringenden Teil des Enzyms (F_0) und bewirken am anderen Ende (im F_1 -Komplex) die ATP-Synthese. Das so gewonnene ATP steht dann als universelle "Energiewährung" [2] für eine Vielzahl energieverbrauchender Reaktionen als Energielieferant zur Verfügung.

über den Protonengradienten werden also die primären Prozesse bei der Reduktion des Sauerstoffs in der Atmungskette bzw. bei der Oxidation des Wassers in den Enzymen des photosynthetischen Apparats an die eigentliche ATP-Synthese angekoppelt. Die molekularen Mechanismen dieser Energieumwandlung sind bislang nur in Ansätzen bekannt, da es äußerst schwierig ist,

die Proteine der Atmungskette und des photosynthetischen Apparats auf molekularer Ebene zu untersuchen. Das klassische Verfahren, die Röntgenstrukturanalyse, scheidet bislang meist aus, da diese Proteine sich infolge ihres amphiphilen Aufbaus in der überwiegenden Zahl der Fälle nicht oder nur in unzureichender Qualität kristallisieren lassen. Darüberhinaus sind die genannten Systeme von sehr großer Komplexität; sie lassen sich zwar in einzelne Proteinkomplexe zerlegen, die auch noch in der Lage sind, Protonentransport durch die Membran zu katalysieren, doch umfassen diese Proteine oft mehr als tausend Aminosäurereste – selbst Sequenzanalysen sind bisher nur in wenigen Fällen erfolgreich gewesen.

Gegenüber diesen hochkomplexen Multienzymsystemen stellt die *Purpurmembra*n der *Halobakterien* ein geradezu ideales Untersuchungsobjekt dar. Unter der Purpurmembra versteht man gewisse Bereiche der Zellmembran dieser Bakterien, die sich unter Sauerstoffmangel ausbilden und die *Bakteriorhodopsin* als Hauptproteinkomponente enthalten, ein Protein, das mit 248 Aminosäureresten vergleichsweise einfach ist. Gewisse strukturelle Merkmale und die Aminosäuresequenz von Bakteriorhodopsin sind bekannt, es existiert eine Fülle elektrochemischer, spektroskopischer, chemischer und anderer Daten, die zum Teil detailliert genug sind, um die beobachteten Effekte bestimmten Gruppierungen zuordnen zu können [3][4]. Bakteriorhodopsin ist – wie der Enzymkomplex des photosynthetischen Apparats – eine lichtgetriebene molekulare Protonenpumpe, d. h. es ist in der Lage, Lichtenergie in elektrochemische Energie umzuwandeln, die nach der Mitchell-Hypothese zur ATP-Synthese und für andere Prozesse genutzt werden kann. Es unterscheidet sich jedoch von dem erwähnten photosynthetischen Enzymkomplex darin, daß bei ihm keine Redoxreaktionen auftreten; in diesem Sinn ist Bakteriorhodopsin kein photosynthetisches Enzym. Es benutzt die Lichtenergie allein zum Aufbau des Protonengradienten, es sind keine weiteren Prozesse beteiligt. Damit stellt Bakteriorhodopsin den Elementarfall eines reinen Protonentranslokators dar, ist entsprechend einfach aufgebaut und liefert den bislang erfolgversprechendsten Ansatz zur Untersuchung solcher Systeme. Es ist natürlich keineswegs sicher, daß die bei Bakteriorhodopsin festzustellenden Mechanismen auch für die komplexeren Systeme gelten, doch bietet die Untersuchung dieses einfachen Falls sicher eine ideale experimentelle wie theoretische Basis für die Untersuchung der komplizierteren

Fälle.

Ein weiterer Bereich, in dem die Untersuchung des Bakteriorhodopsins befruchtend wirken kann, ist die Erforschung der molekularen Basis des Sehvorgangs. Das dort die zentrale Stelle einnehmende Protein *Rhodopsin* ist wie Bakteriorhodopsin ein Membranprotein, das - unter anderem - belichtungsabhängig das Membranpotential verändert [5]-[7]. Es enthält denselben Chromophor wie Bakteriorhodopsin - eine Retinal-Schiffbase zur ε -Aminogruppe eines Lysinrests - und weist offensichtlich ähnliche Strukturmerkmale wie Bakteriorhodopsin auf [8]-[10]. Allerdings bestehen keinerlei signifikante Sequenzhomologien zwischen den beiden Proteinen - ein Gesichtspunkt, der in Anbetracht der vorhandenen sonstigen Ähnlichkeiten auch von evolutionstheoretischem Interesse ist.

Aktiver Protonentransport - wie ihn Bakteriorhodopsin zu katalysieren vermag - läßt sich unter drei Gesichtspunkten betrachten:

1. die eigentliche Umwandlung der Lichtenergie in chemische Energie im aktiven Zentrum des Proteins,
2. der *Protonenleitung*, d. h. der passiven Protonenbewegung über relativ lange Strecken innerhalb des hydrophoben Membransegments,
3. der *Vektorisierung*, d. h. der Ausrichtung des Protonentransports, so daß Protonen nur in einer Richtung gepumpt werden.

Man kann den Transport dann im Prinzip in sieben Phasen einteilen (die nicht notwendigerweise klar unterscheidbar sein und in dieser Reihenfolge vorliegen müssen; so wird Phase 4 i. a. der zeitlich erste Schritt eines solchen Reaktionszyklus sein):

1. Protonenanlagerung an die innere Oberfläche der Membran,
2. Protonenleitung zum aktiven Zentrum,
3. Trennung vom Leitungsabschnitt,
4. Erhöhung des chemischen Potentials des Protons infolge der Lichteinwirkung,

5. Verbindung mit dem zweiten Protonenleitungsabschnitt,
6. Protonenleitung vom aktiven Zentrum an die äußere Oberfläche der Membran,
7. Protonenablösung von der Membran.

Die Phasen 1 und 7 sind in erster Näherung klassische Säure-Base-Reaktionen an einer Grenzfläche, Bindung und Ablösung von Protonen ist von den pK_a -Werten der entsprechenden Gruppen, der Protonenkonzentration und - bei genauerer Betrachtung - der Oberflächenladung der Membran abhängig.

Protonenleitung läßt sich am natürlichsten als eine Folge von Protonentransferreaktionen entlang einer Kette von Wasserstoffbrücken auffassen (sofern kein Carrier-Mechanismus vorliegt, bei dem das Proton mit einer ganzen chemischen Gruppierung, an die es gebunden ist, transportiert wird). Trennung von der Kette kann dann durch das Aufbrechen einer Wasserstoffbrücke erfolgen. Erhöhung des chemischen Potentials eines Protons bedeutet letztlich, daß die Azidität der das Proton tragenden Gruppe bzw. die Basizität eines potentiellen Akzeptors erhöht wird und so das Proton auf eine Gruppe übertragen wird, die im protonierten Zustand eine hohe Protondonorstärke aufweist, so daß ein ausreichend hohes Potentialgefälle zur Membranoberfläche aufgebaut wird.

Zum Verständnis dieser Vorgänge ist eine genaue Kenntnis der Eigenschaften solcher Wasserstoffbrücken, in denen Protonen übertragen werden, unumgänglich. Zu diesen Eigenschaften gehören vor allem die Protonentransfergleichgewichte und deren Abhängigkeit von gewissen Parametern der Umgebung der Wasserstoffbrücke, wie der Dielektrizitätskonstante des Mediums, in dem sich die Brücke befindet, und lokalen elektrischen Feldern. Wasserstoffbrücken dienen ja in biologischen Systemen nicht allein der Strukturbildung und -stabilisierung, sondern spielen eine entscheidende Rolle bei allen Prozessen, in denen Protonen übertragen werden [11][12]. Durch temperaturabhängige Untersuchung von Protonentransfergleichgewichten - wie auch von Bildungsgleichgewichten, die die Stärke der Brücken zum Ausdruck bringen - lassen sich auch Enthalpie und Entropie dieser Prozesse ermitteln (s. z. B. [13]).

Hiervon ausgehend wurde in vorliegender Arbeit versucht, die fundamentalen Eigenschaften einiger Wasserstoffbrücken, die sich im aktiven Zentrum des Bakteriorhodopsins ausbilden können, zu ermitteln und zu zeigen, welche Schlüsse aus diesen Informationen auf die möglichen Mechanismen der Umwandlung von Lichtenergie in chemische Energie in Bakteriorhodopsin gezogen werden können. Auch bezüglich der Protonenleitung lassen sich auf der Basis des Konzepts von Wasserstoffbrücken und Wasserstoffbrückensystemen mit großer Protonenpolarisierbarkeit neue Erkenntnisse gewinnen. Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse wurden an einfachen Modellsystemen gewonnen; mein Ziel war es nicht, durch unmittelbare Untersuchung des Proteins neue Daten über dieses zu gewinnen, sondern einen Beitrag zu einem grundsätzlichen Verständnis der vorhandenen Informationen zu liefern. Insofern sind die in dieser Arbeit vorgestellten mechanistischen Hypothesen nur als Vorschläge zu werten, die in jedem Fall die Verifizierung durch Untersuchungen am Protein erfordern. Die im Rahmen dieser Arbeit ausgeführten infrarotspektroskopischen Untersuchungen können außerdem bei der Interpretation von IR-Differenzspektren, wie sie von Bakteriorhodopsin bereits in großer Zahl veröffentlicht wurden, hilfreich sein.

2 Bakteriorhodopsin

Aus der Literatur bekannte Daten

2.1 Halobakterien, Purpurmembran

Die Halobakterien wurden um die Jahrhundertwende in Skandinavien auf getrocknetem Salzfisch entdeckt [3]. Sie gehören zu den sogenannten Archaeobakterien, das sind prokaryontische Organismen einer frühen Evolutionsstufe, die oft an extreme Umweltbedingungen wie hohe Temperaturen oder - wie im Fall der Halobakterien - an hohe Salzkonzentrationen angepaßt sind. Halobakterien bevorzugen als Medium praktisch gesättigte Natriumchloridlösungen, in verdünnten Lösungen oder gar in reinem Wasser werden sie zerstört.

Ihre Zellwand besteht aus Proteinaggregaten, die mittels Gefrierätztechnik entfernt werden können, so daß die eigentliche Zellmembran freiliegt. Diese zeigt sich nicht homogen, sondern weist Flecken mit einem Durchmesser von etwa $0.5\text{ }\mu\text{m}$ auf, die dem Organismus - bzw. entsprechenden Bakterienkulturen - eine charakteristische violette Färbung verleihen. Diese in die normale Zellmembran eingestreuten Bereiche werden bevorzugt unter anaeroben Bedingungen gebildet und können nach einer Lyse der Bakterien durch reines Wasser von den anderen Membranfragmenten durch Zentrifugation abgetrennt werden. Die dabei erhaltene schwerste Membranfraktion ist eben jene sogenannte Purpurmembran, die sich durch ihre violette Farbe auszeichnet [14].

Diese Purpurmembran entspricht insofern nicht dem üblichen Bild biologischer Membranen, die nach dem Flüssig-Mosaik-Modell aufgebaut sind, als bei diesem die in die Lipidphase eingebauten Proteine innerhalb der Membran frei beweglich sind, während die Purpurmembran eine starre, zweidimensional-kristalline Struktur aufweist. Die einzige darin in höheren Kon-

zentrationen vorkommende Proteinkomponente ist dabei das Bakteriorhodopsin mit einem Gewichtsanteil von 75 % gegenüber 25 % Lipiden. Das Bakteriorhodopsin ist für die violette Farbe verantwortlich, das Absorptionsmaximum liegt bei ca. 570 nm; nach etwa einer halben Stunde im Dunkeln verschiebt es sich auf ca. 560 nm (Dunkeladaptation) [15]–[17]. Durch Belichtung wird ein photochemischer Reaktionszyklus induziert, in dessen Verlauf sich das Absorptionsmaximum intermediär auf 412 nm verschiebt. Mit diesem Photozyklus einher geht der Transport von Protonen aus dem Inneren der Bakterienzelle ins umgebende Medium, so daß infolge der Belichtung ein Protonengradient aufgebaut wird, in dem ein Teil der eingestrahlten Lichtenergie gespeichert wird. Hierbei wird ein Membranpotential von bis zu 300 mV aufgebaut [18]. Das Bakterium kann so auf das Licht als eine zusätzliche Energiequelle zurückgreifen, wenn infolge Sauerstoffmangels die durch die Atmung bereitgestellte Energie nicht ausreicht.

Außer Bakteriorhodopsin enthält die Halobakterienmembran in geringeren Mengen zwei weitere photochemisch aktive und wie Bakteriorhodopsin einen Retinalchromophor enthaltende Proteine: Halorhodopsin, das offensichtlich Chlorid- und damit gekoppelt Natriumionen pumpt und ein phototaktisches Protein [19][20].

2.2 Die molekulare Struktur

In der Purpurmembran liegt Bakteriorhodopsin in einer zweidimensional kristallinen Form vor. Jeweils drei Bakteriorhodopsin-Moleküle bilden ein Trimer; auf diese Weise wird ein hexagonales Kristallgitter aufgebaut. Elektronendichtekarten wurden durch Kombinationen aus Elektronenmikroskopie und Beugungsverfahren erhalten [21]–[24] (Abb. 2.2.1); die hierbei erreichbare Auflösung liegt bei 3.7 Å [24]. Höhere Auflösungen sind im Prinzip an dreidimensionalen Kristallen zu erhalten, die unter Verwendung von Detergentien präpariert werden können [25]–[27]; ihre Qualität ist aber bislang noch nicht ausreichend zur Bestimmung der genauen Molekülstruktur.

Man schließt aber aus diesen Daten (s. Abb. 2.2.1), daß ein Bakteriorhodopsin-Molekül aus sieben weitgehend senkrecht zur Membran stehenden Stäben aufgebaut ist. Bei diesen Stäben handelt es sich nach kristallographischen [22][23], CD- [28] und IR-spektroskopischen [29][30] Daten um α -Helices. Aus Messungen mit polarisierter IR-Strahlung an orientierten Proben [30] kann man sehen, daß drei der sieben Helices exakt senkrecht zur Membranoberfläche stehen, während vier unter einem Winkel von weniger als 28° zur Membrannormalen geneigt sind – ein Ergebnis, das von der aus Beugungsexperimenten erhaltenen Dichtekarte, in der drei Helices sehr deutlich ausgeprägt sind (5, 6 und 7 in Abb. 2.2.1), während die anderen ziemlich verschwommen erscheinen, bestätigt wird. Bei den α -Helices dürfte es sich um eine leicht verzerrte Variante (die sogenannte α_{ix} -Helix) handeln, wie aus der ungewöhnlich hohen Lage der Amid-II-Bande (1665 cm^{-1} statt üblicherweise $1650\text{--}1655\text{ cm}^{-1}$) gefolgert wird [29].

Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, daß der Helixanteil wesentlich geringer ist als allgemein angenommen. So könnte dem Teil des Bakteriorhodopsin-Moleküls, der in Abb. 2.2.1 mit 1 und 2 bezeichnet ist, durchaus β -Faltblattstruktur (möglicherweise vier antiparallele Stränge) entsprechen. Nach CD-Messungen von Jap et al. [31] soll der Helix-Ge-

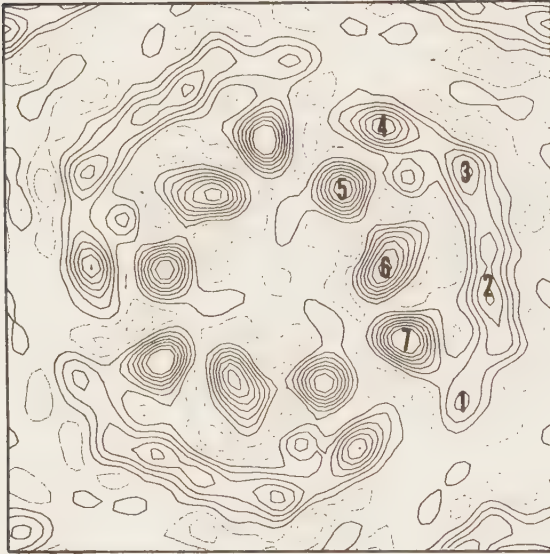


Abb. 2.2.1: Elektronendichtekarte der Purpurmembran, Auflösung 5.2 Å, aus [24]. Die Nummern bezeichnen die α -Helices.

halt ca. 52 % betragen bei einem β -Faltblattanteil von 26 %. Eine Analyse der Amid-I-Bande ergibt, daß sie möglicherweise aus zwei Komponenten zusammengesetzt ist, einer starken Bande bei 1663 cm^{-1} , die von den α -Helices herrührt, und einer schwachen bei 1639 cm^{-1} , die dem β -Strukturanteil zugeschrieben wird [31]. Auch Rothschild und Clark [29] geben einen geringeren Helixanteil als mögliche Ursache des ungewöhnlich niedrigen Dichroismus der Amid-II-Bande an. Es besteht also durchaus die Möglichkeit, daß in Bakteriorhodopsin nur fünf α -Helices die Membran überspannen, wenn auch die meisten Autoren es als gegeben ansehen, daß es sich um sieben Helices handelt.

Die Vorstellung, daß Bakteriorhodopsin aus sieben Helices aufgebaut ist, gründet sich wesentlich auf Beugungsexperimente bzw. die Interpretation der Elektronendichtekarte [22][23]. Eine

gewisse Bestätigung dieser Vorstellung liefert die Aminosäuresequenz des Bakteriorhodopsins. Die Sequenz wurde unabhängig von Ovchinnikov et al. [32] und Khorana et al. [33] erstellt - bei weitgehender Übereinstimmung. Khoranas Sequenz erwies sich nach der Analyse von Herlihy et al. [34] und der Bestimmung der DNA-Sequenz des Bakteriorhodopsin-Gens durch Dunn et al. [35] als die genauere. Bakteriorhodopsin besteht demnach aus 248 Aminosäureresten; außer Cystein und Histidin kommen alle zwanzig Aminosäuren vor (s. Abb. in der hinteren Umschlagseite). Die Einteilung in sieben α -helicale Segmente erfolgt nach der Hydrophobizität der Aminosäurereste - es wird versucht, möglichst wenig polare Gruppen in die hydrophobe Membran einzubetten - und nach den Ergebnissen von enzymatischen Spaltungen [32][36], Jodierungsreaktionen an Tyrosinresten [37] und Antikörperbindungsexperimenten [38][39], die die Regionen der Sequenz anzeigen, die aus der Membran herausragen bzw. vom Medium aus zugänglich sind.

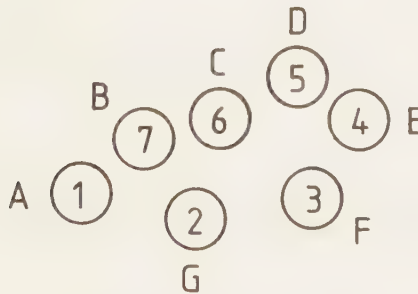


Abb. 2.2.2: Wahrscheinlichste Anordnung der α -helicalen Segmente der Sequenz in der Purpurmembran nach [40].

Es gibt mehrere Versuche, die Segmente, in die die Aminosäuresequenz eingeteilt werden kann, den Stäben in der Dichtekarte zuzuordnen. Engelman et al. [40] geben die in Abb. 2.2.2 gezeigte Anordnung als die wahrscheinlichste an. Üblicherweise werden die Segmente der Sequenz mit den Buchstaben A bis G und die Helices in den Dichtekarten mit den Ziffern 1 bis 7 bezeichnet. Im Modell von Engelman et al. [40] entspricht demnach

Helix 1 dem Segment A, 2 dem Segment G, 3 entspricht F usw.; dies wird mit dem Kürzel AGFEDCB bezeichnet. Agard und Stroud [41] geben zwei Anordnungen als die wahrscheinlichsten an: AGFEDCB wie [40] und ABCDEFG. Andere Anordnungen können jedoch nicht ausgeschlossen werden; Neutronenbeugungsexperimente an Bakteriorhodopsin, das bestimmte Aminosäuren in perdeuterierter Form enthält, mit denen sich die entsprechenden Differenzdichtekarten aufstellen lassen, führen zu Ergebnissen, die im Widerspruch zu den von [40] und [41] postulierten Modellen stehen [42][43]. Alle Anordnungsvorschläge beruhen darüberhinaus auf der Annahme, daß tatsächlich der überwiegende Teil des Proteins in Form von α -Helices vorliegt. Nach einer neueren Arbeit kann aber als gesichert gelten, daß Helix 1 nicht das Segment G darstellt [44].

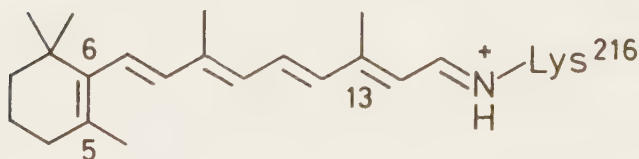


Abb. 2.2.3: Chemische Struktur des Chromophors von Bakteriorhodopsin, einer protonierten Retinal-Schiffbase.

Der Chromophor des Bakteriorhodopsins ist eine Schiffsche Base, die zwischen der ε -Aminogruppe des Lysins 216 [45]–[49] und Retinal gebildet wird (Abb. 2.2.3). Diese Schiffbase liegt im Grundzustand protoniert vor. Der Retinalrest ist dabei unter einem Winkel von ca. 20° [50][51] – nach einer anderen Untersuchung 28° [53] – gegen die Membranoberfläche geneigt. Nach Neutronenbeugungsexperimenten, mit denen die Differenzdichteverteilung zwischen Bakteriorhodopsin, das normales Retinal und Bakteriorhodopsin, das perdeuteriertes Retinal enthält, ermittelt wird, liegt der Cyclohexenring etwa in der Mitte der Membran, d. h. er ist von beiden Oberflächen ungefähr gleich weit entfernt [53]. Das Stickstoffatom der Schiffbase ist infolge der Neigung der Polyenkette etwas näher an einer Oberfläche.

Die Position des Chromophors in der Dichtekarte (Abb. 2.2.1) ist wahrscheinlich so, daß sich der Retinalrest von der Kontaktstelle zwischen den Helices 2 und 3 nach Helix 5 erstreckt [54][55], wobei sich der Cyclohexenring bei Helix 2 befindet [56]. Dies würde auf die Helixzuordnung CDEFGAB hinweisen, die auch von Agard und Stroud [41] in die engere Wahl gezogen wird.

2.3 Die Vorgänge im Photozyklus

Durch Belichtung wird in Bakteriorhodopsin eine zyklische Photoreaktion induziert, in deren Verlauf charakteristische Absorptionsänderungen im sichtbaren Bereich beobachtet werden können. Man kann auf diese Weise eine Reihe von Zwischenstufen unterscheiden, die ursprünglich in der in Abb. 2.3.1 gezeigten Weise angeordnet wurden [57]. Dieses Modell stellte sich jedoch als zu einfach heraus, es zeigte sich, daß einige Zwischenstufen eventuell in zwei Formen vorkommen (M und M' etwa [58]) und daß es sich außerdem nicht um eine lineare Reak-

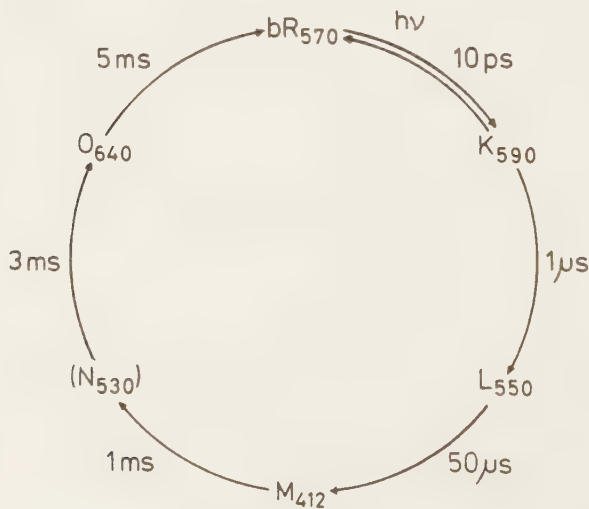


Abb. 2.3.1: Der Photozyklus von Bakteriorhodopsin in der ursprünglich postulierten einfachen Form (nach [57]).

tionsfolge handelt, sondern der Photozyklus auch Verzweigungen aufweist [59][60]. Es gilt als sicher, daß von jeder Zwischenstufe aus durch Belichtung im entsprechenden Wellenlängenbereich eine Rückreaktion zu BR_{570} induziert werden kann [61][62]. Ein Modell des Photozyklus, das einen Großteil der bisherigen Befunde einschließt, zeigt Abb. 2.3.2.

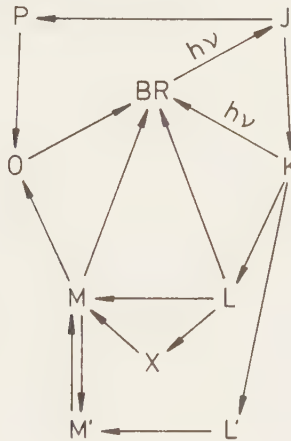


Abb. 2.3.2: Eine Version des Photozyklus, die die bekannten experimentellen Daten so weit wie möglich berücksichtigt (nach [59][60][63]).

Bakteriorhodopsin existiert in zwei Grundformen, einer lichtadaptierten, die bei 570 nm absorbiert (BR_{570}) und einer dunkeladaptierten mit einem Absorptionsmaximum bei 560 nm (BR_{560}) [16][64]. Dunkeladaptiertes Bakteriorhodopsin weist einen eigenen Photozyklus auf, von dem aus es in den lichtadaptierten Zustand übergeht [64]. Die Rückkehr zum dunkeladaptierten Zustand erfolgt thermisch in etwa einer halben Stunde bei Abwesenheit von Licht. Während in BR_{570} der Retinalrest praktisch vollständig in all-trans-Form vorliegt, enthält BR_{560} etwa 50 % 13-cis-Retinal-Schiffbase [16][65]. Hell-Dunkel-Adaptation ist also mit einer Isomerisierung um die 13-14-Doppelbindung verknüpft, die mit einer Isomerisierung um die C=N-Bin-

dung einhergeht [17][66].

Auch im Photozyklus (des lichtadaptierten Proteins) findet eine Isomerisierung des Retinalrests um diese Bindung statt [57][67]–[69], und zwar bereits beim Übergang von BR₅₇₀ nach K₅₉₀ [70]–[72]. Die Konformation des Retinalrests in K₅₉₀ ist allerdings nicht vollständig 13-cis, sondern die Polyenkette ist etwas verdreht [73][74]. Dies hat einen wichtigen Einfluß auf die elektronische Struktur der Schiffbase, deren pK_a dadurch erniedrigt wird (s. Kap. 2.5).

Der Chromophor

Im Grundzustand (BR₅₇₀) ist der Chromophor, die Retinal-Schiffbase, am Imino-Stickstoff protoniert [75]–[77]. In der Zwischenstufe M₄₁₂ hingegen liegt die Schiffbase deprotoniert vor [76][77], was – zumindest zum Teil – die starke kurzwellige Verschiebung des Absorptionsmaximums in M₄₁₂ gegenüber BR₅₇₀ erklärt, da auch Modellsubstanzen (etwa Retinylidenbutylamin) in ihrer protonierten Form bei größeren Wellenlängen absorbieren als als freie Basen. Allerdings absorbieren die Modellsubstanzen sowohl in ihrer protonierten als auch in ihrer nicht-protonierten Form jeweils bei geringeren Wellenlängen als BR₅₇₀ bzw. M₄₁₂, nämlich bei ca. 440 bzw. 390 nm. Die Verschiebung des Absorptionsmaximums der protonierten Form von 440 auf 570 nm (der sog. *Opsin-Shift*) ist besonders auffällig; ihre Ursache ist wahrscheinlich darin zu sehen, daß in Bakteriorhodopsin nicht nur eine negative Ladung in der Nähe des Schiffbase-Stickstoffatoms die positive Ladung kompensiert, sondern darüber hinaus am anderen Ende des Polyens – also in der Nachbarschaft der Cyclohexengruppe – eine zweite negative Ladung lokalisiert ist [78]–[80]. Dies führt zu einer Umordnung der Bindungen im Sinne einer verstärkten Delokalisierung der π -Elektronen und damit zu einer Rotverschiebung des Absorptionsmaximums. Außer dieser Verschiebung des Absorptionsmaximums bewirkt eine solche zweite negative Ladung auch eine Erhöhung der Basizität des Schiffbase-Stickstoffs; sie ist möglicherweise dafür verantwortlich, daß der Chromophor überhaupt protoniert vorliegt (s. Kap. 6.2).

Der Primärschritt

Die Untersuchung der einzelnen Zwischenstufen des Photozyklus kann zum einen durch kinetische Messungen erfolgen, die im Falle der optischen Spektroskopie eine zeitliche Auflösung bis zu 100 Femtosekunden ermöglichen, zum anderen dadurch, daß einige Zwischenstufen bei tiefen Temperaturen (K_{590} , L_{550} [81][82]) oder bei niedrigem Wassergehalt der Probe (M_{412} [83]) festgehalten werden. Bei den kinetischen Messungen beobachtet man eine zusätzliche Zwischenstufe J vor K_{590} [84]–[88]. In dieser Stufe liegt der Chromophor bereits wieder im elektronischen Grundzustand vor, d. h. die Einspeisung der freien Enthalpie der absorbierten Lichtquanten in das Protein-System findet innerhalb von 430 fs statt [88]. Bei diesem Primärschritt handelt es sich im wesentlichen um die – wohl nicht ganz vollständige – trans-cis-Isomerisierung des Chromophors um die 13,14-Bindung [86]–[88], die aus dem angeregten Zustand heraus erfolgt. Eine Protontransferreaktion zwischen Proteinseitengruppen [89][90] kann für diesen Schritt mit ziemlicher Sicherheit ausgeschlossen werden, da bei der Primärreaktion keinerlei Deuterium-Isotopeneffekt beobachtet werden kann [88]; derartige Protontransferreaktionen erfolgen erst später im Photozyklus – induziert etwa durch eine mit der Isomerisierung verbundene Ladungsverschiebung [91][92] (s. a. Kap. 2.5 und 6.2).

Photonen und Protonen

Für die Quantenausbeute der Photoreaktion $BR_{570} \rightarrow M_{412}$ wurde von Oesterhelt und Hess [93] ein Wert von 0.67 ermittelt, der mit der maximalen Ausbeute für die Zahl der Protonen, die je absorbiertem Lichtquant transportiert werden (ca. 0.6, abhängig von pH und Ionenstärke [94]–[98]) gut übereinstimmt. Demnach wird in einem Durchlauf des Photozyklus ein Proton durch die Membran gepumpt. Spätere Arbeiten stellten jedoch niedrigere Quantenausbeuten für die Reaktionen $BR_{570} \rightarrow M_{412}$ und $BR_{570} \rightarrow K_{590}$ fest [98]–[102], die als Hinweis auf eine Stöchiometrie von zwei Protonen je Zyklus gewertet wurden. Nach den Spektren der Zwischenstufen J_{605} und K_{590} [88][103] ist wohl doch ein Wert von ca. 0.6 für die photochemische Quantenausbeute richtig; niedrigere Ausbeuten sind möglicherweise durch zu hohe Belichtungsintensitäten verursacht. Eine endgültige Klärung der

Pumpstöchiometrie steht aber noch aus.

Ladungsverschiebungen

Im Verlauf des Photozyklus finden eine Reihe von Ladungsverschiebungen in der Purpurmembran statt, deren Kinetik sich mit einzelnen Reaktionsschritten korrelieren läßt [104]–[114]. Die von Kesthelyi und Ormos [108][109] angegebenen Werte sind in Tab. 2.3.1 zusammengefaßt; sie beziehen sich auf eine Gesamt-

Ladungsverschiebung [Å]	
$\text{BR}_{570} \rightarrow \text{K}_{610}$	-1.3
$\text{K}_{610} \rightarrow \text{L}_{550}$	-0.2
$\text{L}_{550} \rightarrow \text{M}_{412}$	5
$\text{M}_{412} \rightarrow \text{O}_{640}$	31
$\text{O}_{640} \rightarrow \text{BR}_{570}$	15

Tab. 2.3.1: Ladungsverschiebungen im Photozyklus, nach [108] [109]. Negative Verschiebungen sind in Richtung der zytoplasmatischen Membranoberfläche, also entgegen der Pumprichtung.

dicke der Membran von 50 Å. Man sieht aus diesen Daten, daß bei den ersten Schritten nur geringe Ladungsverschiebungen stattfinden; diese verlaufen zum Teil entgegen der Pumprichtung. Der eigentliche Transportschritt läuft parallel mit dem Zerfall von M_{412} . Der Übergang von O_{640} zurück nach BR_{570} ist mit der Aufnahme des Protons (bzw. der Protonen) von der Innenseite der Membran verknüpft. Die Autoren schließen daraus, daß das aktive Zentrum etwa 10 Å von der inneren Membranoberfläche entfernt ist.

Ein weiteres interessantes Ergebnis der Photostrom-Messungen ist, daß Belichtung von M_{412} mit blauem Licht, die zur unmittelbaren Regenerierung von BR_{570} führt, mit einer Rückverschiebung der Protonen verknüpft ist [61][115]. Bestrahlung von M_{412} führt also nicht zu einem Abschluß des Zyklus mit Pumpen eines Protons, sondern läßt das Protein zu seinem ursprünglichen

Zustand zurückkehren.

Energetik

Weitere Untersuchungen an Bakteriorhodopsin beschäftigen sich mit der Energetik der Photoreaktion [100][116]–[120]. Mittels photoakustischer Kalorimetrie, die die durch Temperaturänderung verursachten Volumenänderungen zur Auswertung heranzieht, lassen sich Näherungswerte für die Wärmetönungen verschiedener Reaktionsschritte erhalten. Annähernd 70 % der Energie des absorbierten Photons werden rasch wieder freigesetzt, die restlichen 30 % der Photonenenergie sind gespeichert und werden nach und nach abgegeben. Im letzten Schritt findet eine Wärmeaufnahme von 70 kJ oder mehr statt, d. h. die Enthalpie des Protein-Lipid-Systems ist in der letzten Zwischenstufe (O_{640}) niedriger als in BR_{570} . Damit eine Reaktion von O_{640} nach BR_{570} stattfinden kann, muß die freie Enthalpie dieser Reaktion negativ sein sein, demzufolge muß in diesem letzten Reaktionsschritt eine erhebliche Entropiezunahme (mehr als 200 J/K·Mol [117][118]) stattfinden, der eine entsprechende Entropieabnahme in den früheren Schritten vorausgegangen ist. Unter der Annahme, daß im letzten Schritt die Protonen von der Innenseite der Membran aufgenommen werden, heißt das, daß diese Protonenaufnahme mit einer Zunahme der Unordnung verknüpft ist, während die zur Protonenabgabe an der Außenseite der Membran führenden Reaktionen eine höhere Ordnung im System bewirken.

Die Wärmeabgabe im ersten Reaktionsschritt wurde von Birge und Cooper [100] bei 77 K kalorimetrisch bestimmt. Demnach liegt K_{590} um 67 kJ/Mol höher als BR_{570} , wobei etwa die Hälfte dieses Betrags in der Ladungstrennung infolge der Isomerisierung des Retinalrests gespeichert sein soll, die andere Hälfte in Form konformationeller Spannung.

Alle diese Beobachtungen über den Ablauf des Photozyklus spiegeln zum einen Veränderungen an der Retinal-Schiffbase wieder – etwa Protonierungs- oder Konformationsänderungen –, zum anderen aber auch Veränderungen an Aminosäure-Seitengruppen des Apoproteins. Mit einigen Methoden lassen sich genauere Aufschlüsse über die beteiligten Gruppierungen erhalten.

Veränderungen an Aminosäureresten

Aus Untersuchungen zur pH-Abhängigkeit der Bildungskinetik von M_{412} wird geschlossen, daß die Deprotonierung eines Tyrosinrests die Voraussetzung für die Bildung von M_{412} , also die Deprotonierung der Schiffbase, darstellt [121]. Diese Beobachtung ist im Einklang mit UV-spektroskopischen Messungen, nach denen kurz vor dem Erscheinen von M_{412} tatsächlich ein Tyrosinrest deprotoniert wird [122][123]. Diese Befunde werden allerdings durch eine neuere Untersuchung [124] in Frage gestellt.

Eine aussichtsreiche Methode zur Untersuchung von Veränderungen an Proteinseitengruppen ist die Infrarot-Differenzspektroskopie. Bei genügend hoher Empfindlichkeit des IR-Geräts - wie sie bei modernen Fourier-Transform-IR-Spektrometern gewährleistet ist - lassen sich im Differenzspektrum Veränderungen an einzelnen Gruppierungen beim Übergang zwischen verschiedenen Stufen einer Reaktion feststellen. Dies geschieht in der Weise, daß vom Spektrum einer Zwischenstufe, die durch geeignete Maßnahmen (z. B. tiefe Temperatur) festgehalten wird, das Spektrum des Grundzustands abgezogen wird [125]-[130]. Eine andere Methode ist die kinetische IR-Spektroskopie, bei der nacheinander bei verschiedenen Wellenzahlen der zeitliche Verlauf der IR-Absorption gemessen wird, so daß man zeitabhängige IR-Spektren erhält [131][132].

Der Vorteil dieser IR-spektroskopischen Verfahren - die Wiedergabe *aller* sich infolge der Reaktion verändernden Bandenstrukturen - stellt gleichzeitig das Hauptproblem dieser Methode dar. Man erhält ein komplexes Absorptionsprofil, dessen Peaks sich nur schwer bestimmten Schwingungen zuordnen lassen. Für diese Zuordnung können nur in begrenztem Maße Spektren von Modellsystemen - niedermolekularen Substanzen in Lösung - herangezogen werden, da sowohl die Lage der Absorptionsmaxima als auch die Intensität der Absorption im Protein oft anders ist als im Modellsystem, was auf die starke Beeinflussung der Bindungspotentiale durch die hochspezifische, anisotrope Umgebung im Protein zurückgeführt werden kann. In abgeschwächter Form existiert dieses Problem auch für die Resonanz-Raman-Spektroskopie, bei der jedoch im Spektrum nur die Banden einer einzelnen Gruppe - des Chromophors - erscheinen, so daß hier eine Zuordnung der Banden zu einzelnen Schwingungsübergängen

leichter möglich ist [133][135].

Dennoch konnten bei Bakteriorhodopsin in den IR-Differenzspektren zwischen einzelnen Zwischenstufen (K_{590} , L_{550} , M_{412} , O_{640}) und BR_{570} zahlreiche betroffene Gruppierungen identifiziert werden. Man erkennt vor allem die Veränderungen am Chromophor, dessen charakteristische Banden durch Vergleich mit Resonanz-Raman-Spektren zugeordnet werden können. Außer diesen findet man noch (sowohl mit kinetischer [132] als auch auch mit FTIR-Differenzspektroskopie [126][128][130]) Veränderungen im Bereich von $1740\text{--}1765\text{ cm}^{-1}$, die dem Entstehen bzw. Verschwinden von Carbonsäuregruppen zugeschrieben werden.

Durch Untersuchungen an Bakteriorhodopsin, das mit ^{13}C -Asparaginsäure angereichert wurde, konnte gezeigt werden, daß es sich bei diesen Carbonsäuregruppen überwiegend um Aspartatreste handelt [130]. Eine dieser Gruppen wird mit einer Zeitkonstante von etwa $60\text{ }\mu\text{s}$ protoniert – also parallel zu Bildung von M_{412} und nur geringfügig nach der Deprotonierung eines Tyrosins [122][123] –, eine weitere etwas später (1.2 ms) [132]. Ihre Deprotonierung erfolgt beim Zerfall von M_{412} (ca. 6 ms). Ein weiterer Asparaginsäurerest wird beim Übergang von K_{590} nach L_{550} deprotoniert und beim Übergang nach M_{412} reprotoniert. Darüberhinaus erfahren zwei Glutaminsäurereste Veränderungen im Photozyklus, einer davon bereits beim Übergang nach K_{590} [137]. Die Lage der Carboxylbanden dieser Carbonsäuregruppen ($1740\text{ bis }1765\text{ cm}^{-1}$) weist darauf hin, daß diese Gruppen nicht oder nur schwach wasserstoffverbrückt sind.

Weitere – relativ schwache – Banden in den IR-Differenzspektren, die keinen Schwingungen des Chromophors zugeschrieben werden können, lassen sich im Bereich etwas unterhalb von 1700 cm^{-1} und zwischen $1500\text{ und }1350\text{ cm}^{-1}$ beobachten; eine Zuordnung ist bislang nicht möglich.

Auf die Rolle, die bestimmte Aminosäurereste für die Funktion des Bakteriorhodopsins spielen, wird im nächsten Kapitel anhand von Untersuchungen, die sich mit der Wechselwirkung des Chromophors mit seiner unmittelbaren Umgebung im Protein und dem Einfluß chemischer Modifikationen von Aminosäuren auf die photochemischen Eigenschaften des Bakteriorhodopsins auseinandersetzen, genauer eingegangen.

2.4 Das aktive Zentrum

Die Rolle einzelner Aminosäurereste

Untersuchungen mit Retinalanalogen

Bakterio-Opsin, das Apoprotein des Bakteriorhodopsins, vermag außer dem natürlichen Cofaktor Retinal auch andere Aldehyde ähnlicher Struktur zu binden. Durch das Studium von Bakteriorhodopsin, das anstatt der Retinal-Schiffbase das entsprechende Addukt eines geschickt ausgewählten Retinalanalogen enthält, lassen sich eine Reihe von Eigenschaften der Retinalbindungsstelle ermitteln.

So läßt sich zeigen, daß keine spezifische Bindungsstelle für die β -Ionon-Gruppierung (das Ende des Retinals, das den Cyclohexenrest enthält) existiert. Der β -Ionon-Rest kann durch - mehr Platz beanspruchende - bityklische Gruppierungen [136]-[138], einen Phenylring [139] oder durch ein azyklisches Strukturelement [140][141] ersetzt werden. Alle diese Retinalanalogen vermögen ein Bakteriorhodopsin zu bilden, das in der Lage ist, Protonen zu pumpen, wenn auch mit geringerer Aktivität als natives Bakteriorhodopsin. Ebenso sind die drei Methylgruppen am Cyclohexenring praktisch ohne Bedeutung für die Funktion des Proteins [142][143]. Größere Substituenten am Cyclohexenring [144] ebenso wie die Naphthylgruppe [137] destabilisieren jedoch die native Konformation des Proteins in der Umgebung des Chromophors, mit der Folge, daß zumindest ein Teil des rekonstituierten Proteins in einer Form vorliegt, bei der das Absorptionsmaximum der Schiffbase zu kleineren Wellenlängen verschoben ist.

Eine größere Rolle spielen die Methylgruppen an der Polyenkette. So führt die Entfernung der 13-Methyl-Gruppe zu einem Protein, das den Retinalrest nur in 13-cis-Konfiguration aufzunehmen vermag und keine photochemische oder Protonenpumpaktivität zeigt. Fehlt dagegen die 9-Methyl-Gruppe, so beobachtet man eine Pumpaktivität von 37 % der von nativem Bakterio-

rhodopsin, wobei der Chromophor in all-trans-Konfiguration vorliegt [145][146].

Durch Einsatz von Retinalanalogen, bei denen zwei Kohlenstoffatome (etwa C_{11} und C_{14} [146]–[148]) so verbrückt sind, daß die Polyenkette in der 13-trans-Konfiguration festgehalten wird, läßt sich prüfen, ob die im Photozyklus beobachtete trans-cis-Isomerisierung tatsächlich für die Energieumwandlung essentiell ist [146]–[149]. Nach diesen Arbeiten zeigt Bakteriorhodopsin, das mit solchen verbrückten Analogen rekonstituiert wurde, praktisch keine photochemische Aktivität; allerdings beobachteten Muradin-Szweykowska et al. [146] bei dem von ihnen untersuchten Bakteriorhodopsin, das 11,14-O-verbrücktes Retinal enthält, eine Restaktivität von 11 %; dieser Befund wird jedoch durch eine neuere Untersuchung von Sheves et al. [148] mit demselben Retinalanalogen nicht bestätigt.

Aussagen über die Wechselwirkung der Polyenkette mit Aminosäure-Seitengruppen lassen sich durch Einsatz von Retinalanalogen, die eine modifizierte Polyenkette enthalten, gewinnen. So führt das Verkürzen der konjugierten Doppelbindungsstruktur am β -Ionon-Ende immer zu einem drastischen Rückgang des sogenannten Opsin-Shifts, d. h. dem Unterschied in der Wellenlänge maximaler Absorption zwischen der protonierten Modellsubstanz (i. a. der entsprechenden Schiffbase mit n-Butylamin) und dem mit dem Retinalanalogen rekonstituierten Bakteriorhodopsin [141][150][151].

Daraus läßt sich ableiten, daß - außer dem unmittelbaren Gegenion zur protonierten Schiffbase in der Nähe des N-Atoms - eine zweite negative Ladung in der Nähe des Cyclohexenrings vorhanden sein muß [78][79]. (Im Falle des Rhodopsins nimmt man ebenfalls an, daß eine zweite negative Ladung in unmittelbarer Nachbarschaft des Chromophors für die langwellige Verschiebung des Absorptionsmaximums verantwortlich ist, dort jedoch in der Nähe von C_{11} [152].) Dies läßt sich auch durch Einsatz von Retinalanalogen zeigen, bei denen C_5 durch ein Stickstoffatom ersetzt ist [80]. Die Beobachtungen führen zu dem Schluß, daß die Ladungsverteilung im aktiven Zentrum des Bakteriorhodopsins symmetrisch ist, d. h. daß einer negativen Ladung am Schiffbase-N-Atom eine zweite negative Ladung am Cyclohexenring entspricht. Letztere Experimente zeigen außerdem, daß die Ladungsverteilung im Retinalrest selbst unsymme-

trisch sein muß, um eine photochemische Reaktionsfähigkeit zu ermöglichen, da mit dem entsprechenden Analogon rekonstituiertes Bakteriorhodopsin, in dem der Chromphor eine symmetrische Ladungsverteilung aufweist, keine Protonen zu pumpen vermag [80].

Protonierungsabhängige Effekte

Weitere Angaben über die Gruppen im aktiven Zentrum lassen sich über die Beobachtung einerseits der Rekonstitutionsreaktion (BR aus Bakterio-Op sin + Retinal), andererseits des Photozyklus in Abhängigkeit vom pH-Wert erhalten. Die Rekonstitution läßt sich kinetisch dadurch sehr genau verfolgen, daß mit 9-cis-Retinal - das nicht gebunden wird - inkubiertes Bakteriorhodopsin kurz belichtet wird. Die Belichtung führt zu einer cis-trans-Isomerisierung bei gleichzeitiger Bindung an Lys²¹⁶ [153]. Es lassen sich dabei im wesentlichen zwei Zwischenschritte beobachten, auf die hier aber nicht näher eingegangen werden soll. Es läßt sich zeigen, daß im aktiven Zentrum zwei Gruppierungen vorhanden sind, deren pK_a -Wert durch die Bindung des Retinals moduliert wird [153]. Andererseits wird auch die Bindung des Retinals durch den Protonierungszustand dieser Gruppierungen kontrolliert [154].

Bei niedrigem pH-Wert verschiebt sich das Absorptionsmaximum von Bakteriorhodopsin von 570 nach 605 nm, was auf die Protonierung einer Carboxylatgruppe zurückgeführt wird [155]-[157]. Eine solche Verschiebung könnte etwa durch Protonierung des Gegenions der Schiffbase verursacht sein. Es gibt gewisse Anzeichen, daß die protonierte Gruppierung dieselbe ist, die auch in O₆₄₀ gegenüber BR₅₇₀ protoniert ist, eine Hypothese, die allerdings durch neuere Untersuchungen wieder in Frage gestellt wird [158][159]. Belichtung dieses BR₆₀₅ führt zu einer Spezies mit einem Absorptionsmaximum bei 500 nm, die 9- und 11-cis-Retinal-Schiffbase enthält und bei Erhöhung des pH-Werts in eine bei 450 nm absorbierende Form übergeht [160][161]. Aus letzterer wird schließlich 9-cis-Retinal freigesetzt [161].

Bei hohem pH-Wert entsteht eine bei 500 nm absorbierende Form, die durch Deprotonierung einer schwachen Säure (etwa eines Tyrosin- oder protonierten Lysin-Rests) gebildet wird und durch Belichtung in eine bei 412 nm absorbierende Spezies über-

geführt wird [155]. Die Schiffbase selbst läßt sich offenbar nicht so leicht deprotonieren; pH-Sprung-Experimente [162] zeigen, daß sie einen scheinbaren pK_a -Wert von ca. 13.3 aufweist (Butylamin-Retinal-Schiffbase hat einen pK_a -Wert von 5.99 [163]). Daraus ist wohl abzuleiten, daß das Schiffbase-Proton sich in einer relativ starken Wasserstoffbrücke zu einer Proteingruppierung befindet und so für andere Basen nicht zugänglich ist.

Chemische Modifikation von Proteinseitengruppen

Informationen darüber, welche Aminosäureseitengruppen mit dem Chromophor wechselwirken oder für die Photoreaktionen von Bedeutung sind, lassen sich durch Untersuchung von Bakteriorhodopsin, bei dem einzelne Reste chemisch modifiziert wurden, erhalten. So läßt sich etwa die Indolgruppe von *Tryptophan* durch Anwendung moderater Konzentrationen von N-Bromsuccinimid (NBS) selektiv - d. h. ohne Veränderung anderer Gruppierungen - oxidieren [164][165]. Dabei wird bei niedrigen Konzentrationen des Reagens ein Tryptophanrest selektiv modifiziert (Trp^{10} oder Trp^{12}), ohne daß dadurch ein nennenswerter Effekt auf die Lage des Absorptionsmaximums oder die Kinetik des Photozyklus erzielt würde [165]. Bei etwas höheren Konzentrationen an N-Bromsuccinimid werden zwei Tryptophanreste oxidiert, wobei jedoch keine Lokalisierung mehr möglich ist, die Reaktion erfolgt offensichtlich unspezifisch und führt primär zu Konformationsänderungen, die dann auch den Photozyklus beeinflussen. Konishi und Packer [166] stellen einen unmittelbaren Einfluß der Reaktion mit NBS auf den Photozyklus fest; nach [164] arbeiteten sie jedoch unter Bedingungen, unter denen auch Tyrosin modifiziert wird. Eine spezifische Wechselwirkung mit dem Chromophor oder eine Rolle im Photozyklus konnte für Tryptophan demnach nicht nachgewiesen werden.

Lysinreste scheinen nach den Modifikationsexperimenten ebenfalls nicht unmittelbar für die photochemische Aktivität von Bakteriorhodopsin von Bedeutung zu sein, wenn man von Lys^{216} absieht, das den Retinalrest trägt. Die Reaktion von 5 (von insgesamt 6) Lysinresten mit Imidoestern oder Essigsäureanhydrid hat jedenfalls nur geringen Einfluß auf den Photozyklus und die Protonenpumpaktivität [167][168]. Eine Acetylierung

hemmt die Protonenleitung nach außen [169]. Dagegen spielen Ionenpaare zwischen Lysin- und Carboxylatgruppen eine wichtige Rolle für die Struktur des Proteins. Die Reaktion mit Carbo-diimiden führt, sofern kein nucleophiles Reagens zugesetzt wird, zur Bildung von Amidbindungen zwischen Glutamin- bzw. Asparaginsäureresten und ϵ -Aminogruppen von Lysin. Solcherart modifiziertes Bakteriorhodopsin ist photochemisch inaktiv, was darauf zurückgeführt werden kann, daß durch diese enge Bindung gewisse Konformationsänderungen unmöglich gemacht werden [167][170].

Ähnliches gilt auch für die Rolle von *Arginin*resten. Ihre Modifikation mit 2,3-Butandion oder Phenylglyoxal führt nicht zu einer Veränderung des Absorptionsspektrums, d. h. es befindet sich kein modifizierbarer Argininrest in unmittelbarer Nähe des Chromophors. Bei Modifikation von 3 von insgesamt 7 Argininen wird der Zerfall von M_{412} stark gehemmt [167][171]. Dies ist ein Indiz für eine Beteiligung am Mechanismus der Reprotonierung der Schiffbase von der Innenseite der Membran, wobei allerdings nicht ausgeschlossen werden kann, daß es sich hierbei nur um einen strukturellen Effekt handelt, der dadurch bewirkt wird, daß modifiziertes Arginin keine Salzbrücken zu Carboxylatgruppen mehr zu bilden vermag; auf einen solchen Effekt weist die Beobachtung hin, daß eine Modifikation von Carboxylatgruppen einen ganz analogen Einfluß ausübt wie die Argininmodifikation [167].

Eine genauere Analyse des M_{412} -Zerfalls nach einer Modifikation von *Carboxylat*gruppen zeigt aber, daß hier doch auch ein spezifischerer Einfluß besteht. Sofern die Modifikation dazu führt, daß die negative Ladung der Carboxylatgruppe durch eine positive ersetzt wird (etwa durch Reaktion mit Carbodiimid + Ethylendiamin), wird die schnelle Phase des M_{412} -Zerfalls beschleunigt [172]. Damit korreliert wird auch die langsamste Phase der Ladungsverschiebung mit einer Zeitkonstanten von 10 ms stimuliert, die der Reprotonierung des Chromophors von innen zugeschrieben wird. Durch dieselbe Modifikation wird auch eine Hemmung der langsamen Phase des M_{412} -Zerfalls bewirkt. Darüberhinaus wird durch die Blockierung von Carboxylatresten die Entstehung von BR_{605} bei niedrigem pH-Wert verhindert [173], ein klares Zeichen dafür, daß diese Spezies durch die Protonierung einer Carboxylatgruppe gebildet wird.

Am deutlichsten wurde ein spezifischer Einfluß auf die photochemische Aktivität von Bakteriorhodopsin für Tyrosin nachgewiesen. Durch Jodierung lassen sich zwei Tyrosinreste unterscheiden: Die Modifizierung des einen führt zu einer Verlangsamung des Zerfalls von M_{412} , ohne den Chromophor zu beeinflussen; er dürfte also in der Nähe der cytoplasmatischen Oberfläche der Purpurmembran lokalisiert sein und eine Rolle bei der Reprotonierung der Schiffbase spielen [174][175]. Der zweite Tyrosinrest ist in unmittelbarer Nachbarschaft des Chromophors, seine Jodierung stimuliert die Bildung von M_{412} , wohl durch Herabsetzung des pK_a der Schiffbase auf etwa 7-8 [175]. Dieses Tyrosin läßt sich auch selektiv nitrieren [176]-[178], wodurch ebenfalls eine Beschleunigung der M_{412} -Bildung um einen Faktor 8 bewirkt wird; gleichzeitig verschwindet die pH-Abhängigkeit der Bildungskonstanten für M_{412} [177]. Die Nitrierung dieses Tyrosinrests - es handelt sich dabei um Tyr²⁶ [176] - führt zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums nach 532 nm; durch Zugabe von Natronlauge läßt sich eine basische Spezies erzeugen, die bei 500 nm absorbiert und in nativem Bakteriorhodopsin nur in einem mit Äther gesättigten Medium produziert werden kann [155]. Diese Beobachtungen stützen die von Kalisky et al. [121] aufgestellte Hypothese, nach der die Deprotonierung eines Tyrosins die Voraussetzung für die Deprotonierung des Chromophors ist (s. Kap. 2.3), und sind im Einklang mit UV-spektroskopischen Messungen von Hess und Kuschmitz [122], die eine solche Deprotonierung vor der Bildung von M_{412} tatsächlich anzeigen.

Ein dritter Tyrosinrest - Tyr⁶⁴ - wurde von Lemke et al. [179] mit einem wasserlöslichen Reagens selektiv diazotiert, wodurch die Protonenpumpaktivität von Bakteriorhodopsin - im Gegensatz zur Modifikation von Tyr²⁶ - blockiert wird. Dieses Tyrosin ist demnach - wie auch Tyr¹³¹ und Tyr¹³³ [37][179] - an der äußeren Oberfläche der Membran lokalisiert; darüberhinaus scheint es für die Protonenleitung vom aktiven Zentrum nach außen von Bedeutung zu sein (s. Kap. 5.1).

Bei all diesen Modifikationsexperimenten ist zu berücksichtigen, daß wohl in vielen Fällen das Reagens wichtige Aminosäurereste gar nicht erreicht, da sie sich tief im Inneren des Proteins befinden und auch gegen kleine Moleküle im Medium abgeschirmt sind. Auch die Aminosäureanalysen zeigen - etwa im Fall von Lysinresten [167] -, daß immer einige Reste der Modifizierung

entgehen. Es ist also nicht auszuschließen, daß wichtige Aminosäuren nicht modifiziert werden, d. h. daß daraus, daß die Modifizierung einer Aminosäure keinen Einfluß auf die photochemische Aktivität ausübt, nicht geschlossen werden kann, daß diese Aminosäure keine Rolle spielt. Dagegen ist die Bedeutung von Tyrosinresten sicher nachgewiesen, ja man kann durchaus sagen, daß es sich bei der Gruppierung mit einem pK_a -Wert um 10, die sich in der Nachbarschaft der Schiffbase befindet [153], um Tyr²⁶ handelt. Ebenso ist wohl durch diese Experimente - im Verein mit Untersuchungen über die pH-Abhängigkeit des Absorptionsmaximums - das Gegenion der protonierten Schiffbase als Carboxylatgruppe - d. h. als Seitenkette eines Aspartat- oder Glutamatrests - identifiziert.

2.5 Modelle und Mechanismen

über die bei der Protonenaktivierung und Protonenleitung ablaufenden molekularen Vorgänge wurden eine Reihe von Vorstellungen entwickelt. Einige von diesen können mittlerweile mit ziemlicher Sicherheit ausgeschlossen werden, so z. B. die Hypothese, der entscheidende Schritt im Photozyklus wäre eine Charge-Transfer-Reaktion zwischen dem Chromophor und einer aromatischen Aminosäureseitenkette [180][181]. Auch die Annahme, daß im Verlauf des Photozyklus die Schiffbase an einer Methylgruppe oder dem Cyclohexenring deprotoniert wird, kann aufgrund von Untersuchungen an mit Retinalanalogen rekonstituierten Systemen ausgeschlossen werden [140][143][146], auch wenn anhand von NMR-Messungen eine starke CH-Azidität von Retinal-Schiffbasen nachgewiesen werden konnte [182].

Ein weiteres Modell zieht die Änderung des pK_a -Wertes des Chromophors infolge der Isomerisierung heran [183][184]. Nach Rechnungen von Schulten und Mitarbeitern ist eine Retinal-Schiffbase in 13-cis/14-s-cis-Konfiguration azider als in all-trans-Konfiguration, insbesondere bei nicht vollständig planarer Konfiguration [185]. Während die kombinierte Isomerisierungsreaktion im Grundzustand eine sehr hohe Aktivierungsenergie aufweist, könnte sie im angeregten Zustand sehr leicht und schnell ablaufen, so daß durch Belichtung der Chromophor in diese azidere Form übergeführt werden kann [185][186]. Gleichzeitig stellt nach diesem Modell die Isomerisierung eine Verbindung - etwa über eine Wasserstoffbrücke - zu einem protonenleitenden System her, über das nun das Schiffbase-Proton nach außen abgegeben werden kann. Die Reaktion zurück zu BR₅₇₀ würde dann in drei Schritten ablaufen: Zuerst eine Rotation um die 14,15-Einfachbindung, die in der deprotonierten Form nicht behindert ist (im Gegensatz zur protonierten), dann die Reprotonierung des Chromophors von der Innenseite mit anschließender Isomerisierung um die 13,14-Bindung; die Aktivierungsenergie für diese Reaktion ist im protonierten Zustand deutlich niedriger als im unprotonierten und wird durch eine negative Ladung am Cyclohexenring weiter erniedrigt.

Bei diesem Modell ist das an das Stickstoffatom der Schiffbase gebundene Proton das Proton, das gepumpt wird. Nach den meisten anderen Modellen stammt zumindest eines von möglicherweise zwei gepumpten Protonen aus der Deprotonierung einer Proteinseitengruppe. Die meisten dieser Modelle basieren auf der Idee der Ladungstrennung infolge des Primärschritts der Photoreaktion, d. h. durch diesen Primärschritt wird - direkt oder indirekt - ein lokales elektrisches Feld aufgebaut, das dann eine Änderung - etwa eine Protontransferreaktion oder eine Konformationsänderung - im Protein induziert.

Für dieses lokale elektrische Feld werden zwei Ursachen angenommen: die Änderung der π -Bindungsstruktur der Schiffbase infolge der optischen Anregung oder die trans-cis-Isomerisierung. Die Retinal-Schiffbase (in protonierter oder deprotonierter Form) weist im angeregten Zustand eine wesentlich stärkere Delokalisierung des π -Elektronensystems auf als im Grundzustand [185][186]. Dies führt etwa im Fall der protonierten Schiffbase zu einer Verschiebung des positiven Ladungsschwerpunkts in Richtung des Cyclohexenrings, die sich in einer Dipolmomentänderung um ca. 12 Debye äußert [187]. Diese Dipolmomentänderung könnte Veränderungen im Protein bewirken (z. B. die Deprotonierung eines Tyrosins in der Nähe des Cyclohexenrings [188]), die ihrerseits diese Bindungsstruktur stabilisieren würden, so daß die veränderte Anordnung auch im Grundzustand stabil sein könnte [90][189][190]. Die andere Möglichkeit wäre, daß die Isomerisierung des Retinalrests - unter der Annahme, daß die Polyenkette räumlich weitgehend fixiert ist, während der Schiffbase-Stickstoff eine gewisse Beweglichkeit aufweist - dazu führt, daß sich der in der Nähe des Stickstoffatoms befindliche Ladungsschwerpunkt vom Gegenion entfernt und so ein lokales elektrisches Feld aufgebaut wird [190]-[192]. Nach neueren Untersuchungen im Femtosekundenbereich [87][88] dürfte der zweite Mechanismus der richtige sein: Primär wird durch die Isomerisierung des Retinalrests ein elektrisches Feld aufgebaut, das in den folgenden Schritten des Photozyklus erst Protontransferreaktionen induziert.

Bezüglich der Protonenleitung wird - i. a. nicht speziell auf Bakteriorhodopsin bezogen - davon ausgegangen, daß Protodonor und -akzeptorgruppen Ketten von Wasserstoffbrücken bilden, über die Protonen von innen zum aktiven Zentrum bzw. vom aktiven Zentrum nach außen transportiert werden können

[193]–[198]. Über die Natur der an diesen Ketten beteiligten Gruppen gibt es keine definitiven Angaben. Nach diesen Modellen werden die Protonen in einem sogenannten "hop/turn"-Mechanismus geleitet, d. h. es erfolgen schrittweise Übertragungen von Protonen von einer Gruppe zur nächsten (oder auch im Rahmen der statistischen Wahrscheinlichkeit wieder zurück) und davon unabhängige Drehungen der protonentragenden Gruppen. Morowitz [194] diskutiert auch die Möglichkeit, daß mehrere Protonen kooperativ in einer Kette von Wasserstoffbrücken tunneln. Eine detailliertere Auseinandersetzung mit diesen Modellen und der Rolle, die ev. auch Wassermoleküle bei der Protonenleitung spielen, erfolgt in Kap. 5.3.

3 Wasserstoffbrücken mit großer Protonenpolarisierbarkeit

3.1 Wasserstoffbrückenbindung und Protonenpotential Protonentransfergleichgewicht, Protonenpolarisierbarkeit, Energetik

Eine Wasserstoffbrücke ist eine relativ schwache chemische Bindung zwischen einem Wasserstoffbrücken- oder Protondonor AH und einem Akzeptor B. A und B können dabei Bestandteile verschiedener Moleküle - man spricht dann von intermolekularen Wasserstoffbrücken - oder ein und desselben Moleküls - bei intramolekularen Wasserstoffbrücken - sein. Die große Bedeutung von Wasserstoffbrücken in biologischen Systemen beruht wesentlich darauf, daß die Bindungsenergien von Wasserstoffbrücken im Bereich thermischer Energien (im biologischen Temperaturbereich) liegen. Einerseits sind Wasserstoffbrücken stark genug, um - etwa im Peptidrückgrat von Proteinen - die spezifische Struktur biologischer Makromoleküle zu stabilisieren, andererseits können sie aber auch durch thermische Bewegung von Gruppen aufgebrochen werden, wenn dies bei einer chemischen Reaktion, z. B. im Rahmen biochemischer Katalyse durch ein Enzym, nötig sein sollte. Auf diese Weise werden die Aktivierungsenergien niedrig gehalten.

Trägt man die potentielle Energie eines wasserstoffverbrückten Systems gegen den Abstand zwischen Donor A und Akzeptor B auf, erhält man das *Bindungspotential* der Brücke. Die für die Dissoziation aufzuwendende Energie je Brücke entspricht der Energiedifferenz zwischen dem niedrigsten Schwingungszustand der A-B-Streckschwingung - der sogenannten Brückenschwingung - und dem Zustand, in dem A und B unendlich weit voneinander entfernt sind.

Protonenpotential

Außer durch dieses Bindungspotential kann eine Wasserstoffbrücke durch das Protonenpotential charakterisiert werden. Dieses Protonenpotential ist die potentielle Energie des Systems plus die kinetische Energie der Elektronen in Abhängigkeit von der Lage des Protons. Abb. 3.1.1a zeigt den Fall eines Protonen-

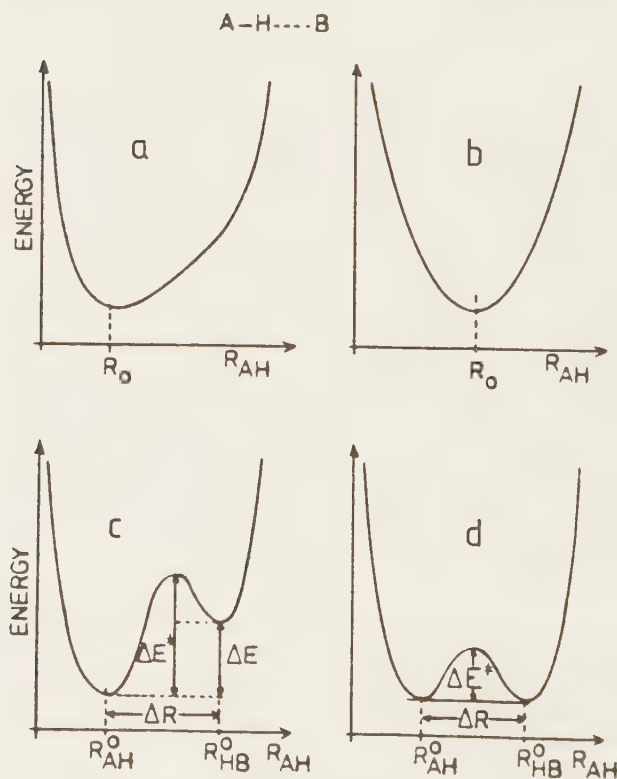


Abb. 3.3.1: Formen des Protonenpotentials von Wasserstoffbrücken, aus [199].

potentials mit unsymmetrischem Einfachminimum, wie er etwa in den $\text{NH}\cdots\text{O}$ -Brücken im Peptidrückgrat von Proteinen anzutreffen ist; das Proton nimmt eine gut lokalisierte Position in der Nähe eines der beiden Partner ein. Der in Abb. 3.1.1b gezeigte Fall ist relativ selten, man beobachtet ihn z.B. in $[\text{F}\cdots\text{H}\cdots\text{F}]^-$ oder manchen starken $\text{OH}\cdots\text{O}$ -Brücken [200]; hier liegt ein breites Einfachminimum vor. Mit den in Abb. 3.1.1c und d gezeigten Fällen befaßt sich im wesentlichen die vorliegende Arbeit; das Proton kann sich in zwei relativ gut definierten Positionen befinden, die im Grenzfall energetisch gleichwertig sind.

Protontransfergleichgewicht

Ein solches symmetrisches Doppelminimumpotential trifft man bei struktursymmetrischen Wasserstoffbrücken - d. h. Brücken, bei denen beide Partner von der gleichen Gruppierung gebildet werden - an, wenn diese von ihrer Umgebung isoliert sind; in realen kondensierten Systemen ist jedoch das Protonenpotential durch die Umgebung immer mehr oder weniger deformiert, d. h. eine der beiden Mulden des Protonenpotentials ist tiefer als die andere; ein Protontransfer zieht eine entsprechende Umordnung der Umgebung nach sich. Ein wichtiges Beispiel eines solchen struktursymmetrischen Systems, an dem auch viele Eigenschaften einer solchen Brücke untersucht wurden, ist das in wäßrigen Säurelösungen vorliegende H_5O_2^+ -Ion, in dem jeweils ein Wassermolekül die Rolle des Protondonors bzw. -akzeptors spielt [201]-[204]. Jedoch können auch Wasserstoffbrücken mit zwei verschiedenen Partnern ein solches Doppelminimumpotential aufweisen, z. B. im Fall einer Essigsäure-Imidazol-Brücke



Abb. 3.1.2: Protontransfergleichgewicht in einer Essigsäure-Imidazol-Wasserstoffbrücke.

(Abb. 3.1.2) [205]. In so einem Fall liegen dann zwei Spezies im Gleichgewicht vor: eine, in der sich das Proton an der Essigsäure befindet, und eine andere, in der es am Imidazol-Stickstoff lokalisiert ist; dieses Gleichgewicht wird als Protontransfergleichgewicht bezeichnet; man kann es allgemein durch die Formel $AH \cdots B \rightleftharpoons A^- \cdots HB^+$ symbolisieren. Die beiden im Gleichgewicht befindlichen Strukturen lassen sich spektroskopisch unterscheiden (s. Kap. 3.2); auf diese Weise kann man die entsprechende Gleichgewichtskonstante ermitteln.

Die Lage dieses Protontransfergleichgewichts ist vom ΔpK_a , d. h. der Differenz zwischen den pK_a -Werten von protoniertem Protonakzeptor und Protondonor, abhängig. Innerhalb einer Systemfamilie gilt für diese Beziehung die Gleichung von Huyskens [206]:

$$\lg K_{pt} = \xi \cdot \Delta pK_a - \delta.$$

Eine Systemfamilie ist dabei eine Gruppe chemischer Verbindungen, die dieselben Protondonor- und -akzeptorgruppen besitzen. Die Verbindungen haben unterschiedliche pK_a -Werte, da sie verschiedene Substituenten besitzen; diese Substituenten zeigen

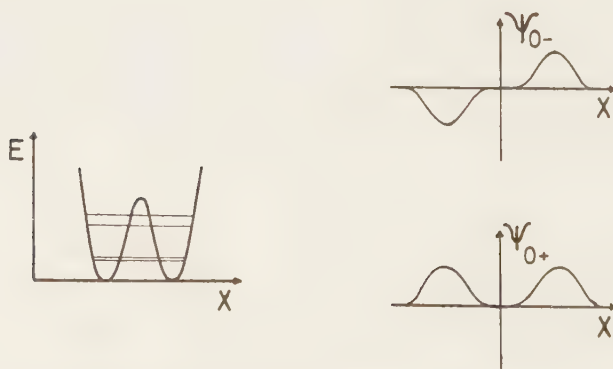


Abb. 3.1.3: Schwingungsenergieniveaus in einem symmetrischen Doppelminimumpotential und die Eigenfunktionen der beiden niedrigsten Zustände.

jedoch ähnliche Wechselwirkungen mit ihrer Umgebung [207].

Mit Hilfe der Huyskens-Gleichung lassen sich auch K_{pt} -Werte von Wasserstoffbrücken, die sich aus technischen Gründen der unmittelbaren Bestimmung entziehen, durch Extrapolation ermitteln (s. Kap. 4.5 und 4.7).

In einem Doppelminimumpotential liegen – sofern es nicht zu unsymmetrisch ist – die beiden niedrigsten Schwingungsniveaus sehr dicht beisammen (Abb. 3.1.3a). Das eine Niveau ist dabei durch eine symmetrische, das andere durch eine antisymmetrische Wellenfunktion gekennzeichnet (Abb. 3.1.3b) [208]. Die Quadrate dieser Wellenfunktionen geben die Aufenthaltswahrscheinlichkeit des Protons an und sind in diesem Fall einer symmetrischen Brücke symmetrisch. Durch ihren geringen Abstand können sich diese Energieniveaus unter der Einwirkung einer äußeren Störung sehr leicht überlagern; das Quadrat einer solchen überlagerten Wellenfunktion ist dann nicht mehr symmetrisch, die Aufenthaltswahrscheinlichkeiten des Protons an den beiden Partnern sind nicht mehr gleich groß. Eine solche Mischung der Energieniveaus kann etwa durch elektrische Felder induziert werden, man spricht dann von einer Polarisierung der Brücke. Analytische [201] und SCF-Rechnungen [203][204] am $H_5O_2^+$ -Ion zeigen, daß eine solche Polarisierung bereits durch relativ geringe elektrische Felder bewirkt werden kann; die entsprechenden *Protonenpolarisierbarkeiten* sind einige Größenordnungen höher als übliche Elektronenpolarisierbarkeiten, die durch die Deformation der Elektronensysteme zustandekommen. Die durch das Anlegen eines elektrischen Feldes geänderte Aufenthaltswahrscheinlichkeit des Protons spiegelt sich in einem geänderten Protonenpotential wieder (Abb. 3.1.4).

Nur in einer Wasserstoffbrücke, die ausreichende Protonenpolarisierbarkeit zeigt, kann das Proton durch äußere Einflüsse auf die Brücke in dieser verschoben werden, d. h. nur in Brücken mit ausreichend großer Protonenpolarisierbarkeit können Protontransferreaktionen induziert werden. Aus diesem Grund ist es wichtig festzustellen, welche Wasserstoffbrücken eine solche hohe Protonenpolarisierbarkeit aufweisen. Wie im nächsten Abschnitt ausführlicher erläutert wird, werden solche Brücken durch eine Untergrundabsorption im Infrarotspektrum, das sogenannte *IR-Kontinuum* angezeigt.

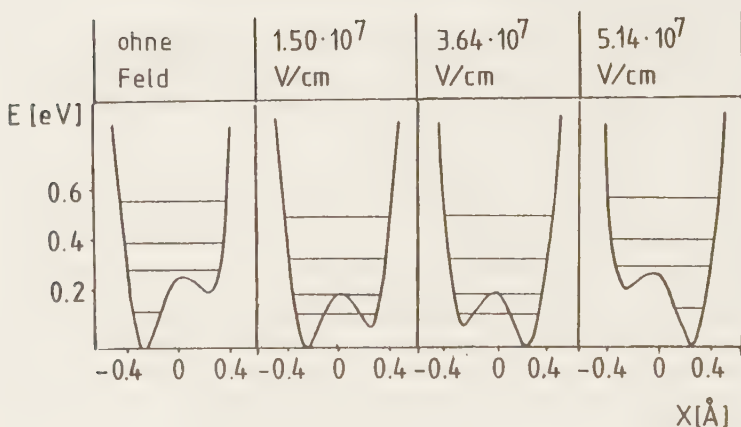


Abb. 3.1.4: Protonenpotential einer Wasserstoffbrücke mit großer Protonenpolarisierbarkeit in Abhängigkeit von einem auf die Brücke einwirkenden elektrischen Feld (nach [204]).

Energetik

Am Entstehen dieses IR-Kontinuums wesentlich beteiligt ist dabei die Umgebung der Wasserstoffbrücken. Diese Umgebung – d. h. das Medium, in dem sich die Moleküle befinden (etwa das Lösungsmittel), aber auch andere Ionen oder Wasserstoffbrücken in diesem Medium – sind von entscheidender Bedeutung für die Eigenschaften einer solchen Brücke. In der Tat ist es so, daß von ungeladenen Brücken (s. u.) *im Vakuum* nur Brücken zwischen sehr saueren Protondonoren und sehr basischen Akzeptoren überhaupt ein Doppelminimumpotential aufweisen (etwa $BrH \cdots NH_2CH_3$; bei der analogen Brücke mit HCl ist das Proton noch am Chlorid lokalisiert) [209]. Es ist also so, daß das Lösungsmittel die polare Grenzstruktur, d. h. die durch $A^- \cdots HB^+$ symbolisierte Spezies begünstigt, und zwar umso mehr, je polarer dieses Lösungsmittel ist.

Man kann demzufolge die freie Enthalpie des Protontransfers ΔG_{pt}° in zwei Komponenten aufteilen, einen intrinsischen Term ΔG_o° , der allein von der Brücke herrührt, und einen extrinsischen Term ΔG_i° , der dem Umgebungseinfluß zuzuschreiben ist. Die Protontransfergleichgewichtskonstante K_{pt} ist dann durch die Summe der beiden Terme bestimmt:

$$-R \cdot T \cdot \ln K_{pt} = \Delta G_o^\circ + \Delta G_i^\circ.$$

Beide Terme lassen sich in die entsprechenden Enthalpie- und Entropieterme auflösen, man erhält dann:

$$\begin{aligned} -R \cdot T \cdot \ln K_{pt} &= \Delta H_{pt}^\circ - T \cdot \Delta S_{pt}^\circ \\ &= \Delta H_o^\circ + \Delta H_i^\circ - T \cdot (\Delta S_o^\circ + \Delta S_i^\circ). \end{aligned}$$

Durch Bestimmung von K_{pt} in Abhängigkeit von der Temperatur lassen sich - wie in vorliegender Arbeit für einige Systeme geschehen - die ΔG_{pt}° -Werte nach ΔH_{pt}° und ΔS_{pt}° aufschlüsseln; eine weitere Aufteilung nach intrinsischen und extrinsischen Faktoren ist durch Variation des Mediums möglich [210][211].

Bezüglich der Größen dieser Terme muß man zwischen geladenen und ungeladenen Wasserstoffbrücken unterscheiden. Eine geladene Brücke ist z. B. die in dieser Arbeit betrachtete Phenol-Acetat-Brücke



die natürlich mit einem Kation assoziiert ist, das möglichst groß und inert sein sollte, um die Brücke so wenig wie möglich zu beeinflussen. (Um eine geladene Brücke handelt es sich auch bei dem erwähnten H_5O_2^+ -Ion, das aber natürlich in dieser Betrachtung uninteressant ist, da beide Grenzstrukturen identisch und damit energetisch gleichwertig sind.) Bei einer geladenen Brücke sind *beide* Grenzstrukturen geladen; beim Übergang von einer Grenzstruktur zur anderen wird zwar das Dipolmoment der Brücke sein Vorzeichen wechseln, sich aber dem Betrag nach nicht allzusehr ändern. Demzufolge werden sich beide Spezies in ihrer Wechselwirkung mit der Umgebung nicht allzusehr unterscheiden, so daß das Protontransfergleichgewicht hauptsächlich von den intrinsischen Termen ΔH_o° und ΔS_o° bestimmt wird.

Bei ungeladenen Brücken, wie etwa der erwähnten Essigsäure-Imidazol-Brücke oder auch den in dieser Arbeit behandelten Wasserstoffbrücken zwischen Phenolen bzw. Carbonsäuren und einer Retinal-Schiffbase, gibt es zwei sich deutlich unterscheidende Grenzstrukturen, eine unpolare Struktur mit relativ geringer Wechselwirkung mit der Umgebung und eine polare Grenzstruktur, in der der nun deprotonierte Donor negativ, der protonierte Akzeptor positiv geladen ist und die auch als Ionenpaar oder, v. a. in der biochemischen Literatur, als Salzbrücke bezeichnet wird. Diese polare Spezies zeigt naturgemäß eine starke Wechselwirkung mit der Umgebung. Dabei ist ΔH_1° negativ und betragsmäßig umso größer, je polarer das Medium ist. Dasselbe gilt infolge der durch die lokalisierten Ladungen in der Umgebung induzierten Ordnung für ΔS_1° . Während also ΔH_1° die polare Struktur begünstigt (und den Protontransfer erst möglich macht), wirkt der Entropieterm $-T \cdot \Delta S_1^\circ$ in der anderen Richtung, ohne aber i. a. den Enthalpieeffekt kompensieren zu können.

3.2 Infrarotspektroskopische Eigenschaften von Wasserstoffbrücken

Die Infrarotspektroskopie ist eine ausgezeichnete Methode zur Untersuchung von Systemen, die Wasserstoffbrücken auszubilden vermögen. Im folgenden werden eine Reihe wichtiger Eigenschaften von Wasserstoffbrücken diskutiert, die im IR-Spektrum ihren Niederschlag finden.

Ausbildung von Wasserstoffbrücken

Die AH-Valenzschwingung des Protondonors im Bereich $3600\text{--}3300\text{ cm}^{-1}$ verschiebt sich bei Ausbildung einer Wasserstoffbrücke zu kleineren Wellenzahlen, da das Protonenpotential aufgeweitet wird und sich sowohl die absolute Höhe als auch der Abstand der Energieniveaus verringern [212]. Man kann diese Erniedrigung der AH-Schwingungsfrequenz auch anschaulich als Folge einer Verringerung der Bindungsordnung der AH-Bindung und damit einer Erniedrigung der Kraftkonstante der entsprechenden Schwingung auffassen.

Gleichzeitig mit der Verschiebung verbreitert sich diese Bande auch, und zwar umso mehr, je breiter das Protonenpotential in der entstehenden Wasserstoffbrücke ist. Liegt gar ein Doppelmimumpotential (oder auch ein Einfachminimum mit sehr breiter, flacher Mulde) vor, so geht die AH-Valenzschwingung ganz in der kontinuierlichen Absorption (s. u.) auf [213]. Die Ausbildung der Brücke ist dann am Verschwinden der AH-Streckschwingung erkennbar.

Für diesen Zweck sind manchmal auch andere Banden, die ihre Lage bei der Bildung einer Wasserstoffbrücke verändern, geeignet, so z. B. die Bande der C=O-Valenzschwingung von Carbonsäuren, die sich um ca. $50\text{--}100\text{ cm}^{-1}$ zu kleineren Wellenzahlen verschiebt. Eine weitere Bande, die mit der Ausbildung von Wasserstoffbrücken verknüpft ist, ist die der AH-in-plane-De-

formationsschwingung im Bereich $1400\text{--}1200\text{ cm}^{-1}$, die in der Brücke zu höheren Wellenzahlen verschoben ist. Bei dieser Schwingung findet man oft eine Kopplung mit anderen Schwingungen (etwa der C-O-Streckschwingung in Carbonsäuren) [214].

In Mischungen zwischen Donor und Akzeptor in einem geeigneten Lösungsmittel läßt sich anhand der Absorption dieser Banden das Bildungsgleichgewicht bestimmen (s. Kap. 4.4), das ein Maß für die relative Stärke der Brücke darstellt. Aus der Gleichgewichtskonstanten (K_b) läßt sich ΔG_b° berechnen; durch temperaturabhängige Bestimmung dieser Werte ist eine Auflösung nach Brückenbildungsenthalpie und -entropie möglich, so daß man auf diese Weise die zum Aufbrechen einer Brücke nötige Energie und andere thermodynamische Daten erhalten kann.

Auch Kopplung mit anderen Schwingungen ähnlicher Frequenz kann ein Indiz für die Ausbildung von Wasserstoffbrücken sein; ein wichtiges Beispiel ist die Kopplung durch Fermi-Resonanz zwischen C=O-Schwingungen der Nucleobasen Guanin und Cytosin im CG-Basenpaar, die zu einem Auseinanderwandern der beiden Banden führt; anhand dieses Effekts kann man das Schmelzen von DNS IR-spektroskopisch verfolgen [215]. Bei elektromagnetischer Kopplung kann eine solche Fermi-Resonanz nur bei entsprechender räumlicher Orientierung der Übergangsmomente auftreten, so daß sie auch Schlüsse bezüglich der räumlichen Anordnung der Wasserstoffbrücken ermöglicht [216].

Ein noch wenig erforschter Schwingungstyp ist die sogenannte Brückenschwingung, bei der sich Donor und Akzeptor gegeneinander bewegen. Sie tritt im fernen Infrarot (FIR) im Bereich $400\text{--}10\text{ cm}^{-1}$ auf und aus ihrer Lage läßt sich unmittelbar die Kraftkonstante der Brücke und damit ihre Stärke berechnen [217]. Untersuchungen im FIR erfordern jedoch einen besonderen apparativen Aufwand, können jedoch mit modernen Fourier-Transform-IR-Spektrometern auch routinemäßig ausgeführt werden.

Protonentransfergleichgewicht

Bei Wasserstoffbrücken, in denen unpolare und polare Grenzstruktur im Gleichgewicht ($AH \cdots B \rightleftharpoons A^- \cdots HB^+$) vorliegen, ist es in vielen Fällen möglich, anhand des IR-Spektrums die Konzentration der jeweiligen Spezies und damit die Gleichgewichtskonstante zu ermitteln. Voraussetzung dafür ist, daß es charakteristische Banden für eine der im Gleichgewicht vorhandenen und sich durch die Reaktion verändernden Gruppen gibt. Beispiele, die in dieser Arbeit angewendet werden, sind die C=O-Valenzschwingung von Carbonsäuren im Bereich $1800-1700\text{ cm}^{-1}$, die bei Deprotonierung verschwindet bzw. in eine CO_2^- -Schwingung bei niedrigeren Wellenzahlen übergeht, oder die C=N-Valenzschwingung der Retinal-Schiffbase, deren Lage vom Protonierungszustand abhängig ist.

Um aus der Absorption einer Bande die Konzentration der entsprechenden Spezies zu berechnen, muß der Extinktionskoeffizient dieser Bande bekannt sein. Um wirklich das Protonentransfergleichgewicht zu erhalten, ist es nötig, auch den Grad der Assoziation zu kennen, der wie oben beschrieben bestimmt werden kann. Einzelheiten über die Auswertung der IR-Spektren findet man in den Kapiteln 4.4 bis 4.7.

Durch Variation der Temperatur kann man auch hier die thermodynamischen Parameter ΔH_{tr}° und ΔS_{tr}° bestimmen (s. Kap. 4.4).

Protonenpolarisierbarkeit

Wie bereits erwähnt, beobachtet man in Systemen, die ein Protonenpotential mit einem Doppelminimum oder einem breiten Einfachminimum aufweisen, im Infrarotspektrum eine kontinuierliche Untergrundabsorption im Bereich $3300-600\text{ cm}^{-1}$. Wie durch theoretische [201]–[220] und experimentelle (s. z. B. [203][218]–[220]) Untersuchungen gezeigt wurde, ist dieses IR-Kontinuum ein sicheres Indiz für das Vorhandensein von Wasserstoffbrücken mit großer Protonenpolarisierbarkeit. Die Entstehung der kontinuierlichen Absorption kann folgendermaßen verstanden werden:

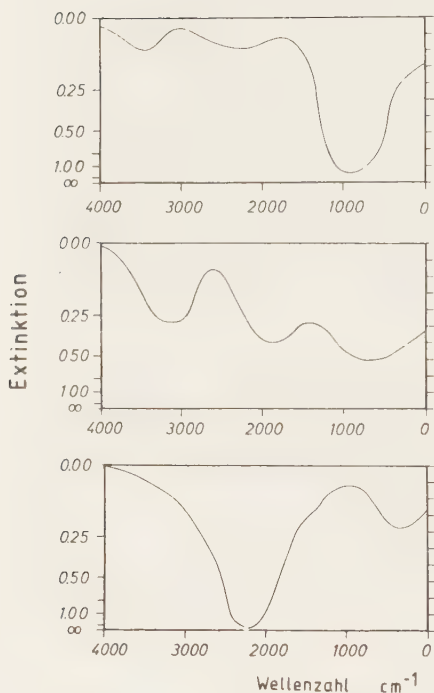


Abb. 3.2.1: Berechnete IR-Kontinua für das H_5O_2^+ -Ion bei verschiedenen O-O-Abständen;
von oben nach unten:
2.5 Å, 2.6 Å, 2.7 Å
(aus [204]).

Durch die hohe Protonenpolarisierbarkeit reagieren das Protonenpotential und die Schwingungsniveaus sehr empfindlich auf Einflüsse der Umgebung (s. Kap. 3.1). Ein solcher Einfluß ist z. B. die Induktionswechselwirkung, die auf die elektrischen Felder geladener Gruppen oder statische bzw. induzierte Dipole zurückzuführen ist. Dieser Effekt ist in seiner Stärke von der relativen Lage und Orientierung der beteiligten Gruppen abhängig. Diese sind in Lösung jedoch starken statistischen Schwankungen unterworfen, d. h. die Stärke des Einflusses auf die Wasserstoffbrücken weist eine große Bandbreite auf. Damit werden aber die Potentiale sehr unterschiedlich stark deformiert, wodurch sich eine Vielzahl mehr oder weniger unterschiedlicher

Schwingungsübergänge ergeben, die sich im Spektrum überlagern. Weitere Effekte, die die Zahl der möglichen Übergänge erhöhen, sind die Protonendispersionswechselwirkung, die von der elektrostatischen Kopplung von Protonenbewegungen in verschiedenen Brücken herrührt, sowie die Kopplung zwischen verschiedenen Schwingungen, z. B. der AH-Valenzschwingung mit der Brückenschwingung.

Für das H_5O_2^+ -Ion wurde die kontinuierliche Absorption für verschiedene Brückenlängen (die in der Rechnung jeweils festgehalten wurden) berechnet [204]; das Ergebnis ist in Abb. 3.2.1 gezeigt. Man erkennt, daß das Kontinuum eine charakteristische Bandenstruktur aufweist, die von der Brückenlänge abhängig ist. Als Faustregel, die auch experimentell bestätigt wurde (s. z. B. [200][218]), kann man sagen, daß bei langen Brücken das Kontinuum seine größte Absorption bei relativ hohen Wellenzahlen hat, während es sich bei kürzeren Brücken nach kleineren Wellenzahlen verschiebt. Auf diese Weise lassen sich anhand der Form des IR-Kontinuums auch qualitative Aussagen über Länge - und damit auch Stärke - einer Wasserstoffbrücke machen.

3.3 Wasserstoffbrückensysteme mit großer Protonenpolarisierbarkeit

Protonenpolarisierbarkeit und damit die Möglichkeit, Protonen zu verschieben, weisen nicht nur einzelne Wasserstoffbrücken auf, sondern auch aus mehreren Brücken zusammengesetzte Systeme. Ein Beispiel für ein solches Phänomen bietet die anomale Protonenleitfähigkeit in Eis, die sogenannte Grotthuss-Leitfähigkeit. Die Leitfähigkeit von Eis nimmt dabei mit abnehmender Temperatur zu [221], was auf die größere Stabilität von Wasserstoffbrückenketten bei tiefer Temperatur zurückzuführen ist. Bei Temperaturen unter 100 K nimmt die Leitfähigkeit jedoch wieder ab, da dann die Reorientierung der OH-Gruppen, die nach dem Protonentransferschritt stattfinden muß, geschwindigkeitsbestimmend wird [221] (s. Kap. 5.2).

In dieser Arbeit wird noch genauer auf das System Asp⁻-6 Tyr-Glu, das für die Protonenleitung vom aktiven Zentrum des Bakteriorhodopsins nach außen als verantwortlich angesehen werden kann, eingegangen werden (s. Kap. 5.1). SCF-Rechnungen an einem Modellsystem (Ameisensäure-Wasser-Formiat) zeigen, daß die Protonenverschiebungen in den das System aufbauenden Brücken zwar korreliert erfolgen, aber keineswegs simultan. Der Protonenleitungsvorgang beginnt in diesem Fall mit einer Protonenübertragung vom Wasser zum Formiat, der dann die Reprotonierung des Hydroxidions durch die Säure folgt [222].

Bei der theoretischen Behandlung solcher Systeme sind SCF-Rechnungen - trotz des viel größeren Rechenaufwands, der u. U. die Beschränkung auf vereinfachte Systeme erfordert - anderen Verfahren vorzuziehen, da nur diese die quantenmechanische Kopplung zwischen allen Protonen und Elektronen richtig widerzugeben vermögen. Dabei ist es unverzichtbar, sowohl Protonendonor am einen Ende der Kette als auch Protonakzeptor am anderen Ende in die Rechnung miteinzubeziehen; Modelle, die diese Gruppen nicht einbeziehen (s. z. B. [194]), führen nicht zu einer korrekten Beschreibung des Protonenleitungsvorgangs.

Auf diese Weise erhält man außer Informationen über Mechanismus und Energetik von Protonenleitungsvorgängen auch Daten, mit deren Hilfe sich die IR-spektroskopischen Eigenschaften solcher Systeme ermitteln lassen, insbesondere der Verlauf der im vorangegangenen Kapitel besprochenen kontinuierlichen Absorption, die in solchen Ketten infolge der großen Dipolmomentänderung bei der Protonenübertragung besonders stark sein sollte. Auf diese Weise ist eine Überprüfung der Theorie durch das Experiment gewährleistet.

In einigen Fällen wurde das Vorhandensein von Wasserstoffbrückensystemen mit großer Protonenpolarisierbarkeit anhand der kontinuierlichen Absorption nachgewiesen [223]. So tendieren in Polyaminosäurefilmen aus $(\text{Lys})_n$, $(\text{His})_n$ oder $(\text{Glu})_n$ Phosphationen, die bei der Herstellung der Filme zugegeben wurden, dazu, wasserstoffverbrückte Ketten und Netze zu bilden, die sich in einem sehr starken IR-Kontinuum äußern. Die Bildung dieser Systeme ermöglicht Schlüsse auf die Rolle, die Phosphationen bei Protonenübertragungen in biologischen Systemen spielen.

3.4 Rolle von Wasserstoffbrücken mit großer Protonenpolarisierbarkeit in biologischen Systemen

üblicherweise werden Wasserstoffbrücken in der Biophysik nur unter dem Aspekt der Strukturbildung und -stabilisierung betrachtet; im Hinblick auf Reaktionsmechanismen wird ihnen nur Bedeutung zugewiesen, insofern bei den jeweiligen Reaktionen Wasserstoffbrücken aufbrechen oder gebildet werden. In vielen enzymkatalysierten Reaktionen sind jedoch auch Protonenübertragungen von entscheidender Bedeutung. Ein bekanntes Beispiel einer solchen Reaktion ist die Katalyse der Spaltung von Peptidbindungen durch proteolytische Enzyme wie Trypsin oder Chymotrypsin. Ein wichtiger Schritt in dieser Reaktion ist der nucleophile Angriff eines deprotonierten Serinrests (d. h. eines Alkoholatanions) auf den Acylkohlenstoff der zu spaltenden Peptidbindung. Dazu muß jedoch der Serinrest erst deprotoniert werden, trotz des hohen pK_a -Werts der Alkoholgruppe. Nach der in Abb. 3.4.1 gezeigten Hypothese erfolgt diese Deprotonierung über ein sogenanntes Proton-Relay-System; bei Annäherung des Substrats werden die Protonen in den beiden Wasserstoffbrücken zum Aspartat verschoben [224][225]. Ein solcher Mechanismus ist nur denkbar, wenn das System Asp^- -His-Ser große Protonenpolarisierbarkeit aufweist, da nur dann die durch die Annäherung des Substrats bewirkte Änderung des lokalen elektrischen Feldes den Protontransfer ermöglicht. Nach Untersuchungen an Modellsystemen ist diese Protonenpolarisierbarkeit hier tatsächlich gegeben [12][226]-[229].

Als weitere Beispiele für Enzyme, bei denen Protonentranslokationen eine Rolle spielen, seien die Fettsäuresynthetase, das Penicillopepsin (s. [11]) und die Leberalkoholdehydrogenase [230][231] genannt. Bei letzterer ist möglicherweise ein Proton-Relay-System für die Deprotonierung des Substrats verantwortlich, dessen Azidiät durch Bindung an ein Zinkion erhöht wurde [230]. Außerdem sind hier alle Proteine anzuführen, deren Aufgabe es ist, Protonen über eine Membran hinweg zu transportieren.

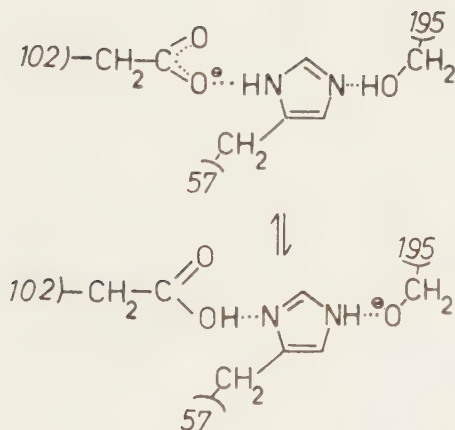


Abb. 3.4.1: Proton-Relay-System im aktiven Zentrum von Serinproteasen.

Wasserstoffbrücken mit großer Protonenpolarisierbarkeit können sich zwischen Aminosäureseitengruppen ausbilden, aber auch zwischen Seitengruppen und kleinen Molekülen, die in Proteinen anwesend sind, z. B. Phosphatgruppen. Für viele dieser Brücken konnten anhand von Untersuchungen an Modellsystemen große Protonenpolarisierbarkeiten nachgewiesen werden; die Protonentransfergleichgewichte vieler dieser Brücken wurden bestimmt [11][226]–[229][232]–[234].

Es zeigt sich, daß die Protonentransfergleichgewichte in diesen Systemen mit den pK_a -Werten der an der Brücke beteiligten Gruppen nach der Huyskens-Gleichung (s. Kap. 3.1) korreliert sind. Der pK_a -Wert allein ist jedoch nur von begrenzter Aussagekraft. Der pK_a -Wert gibt ja das Protonentransfergleichgewicht zwischen einer Säure und Wasser an, und zwar in Wasser als Medium und bei idealerweise unendlicher Verdünnung der Säure. Im Protein dagegen liegt meist eine hydrophobe Umgebung vor, Protondonor und -akzeptor sind unmittelbar über eine Wasserstoffbrücke verbunden, i. a. ohne Vermittlung von Wasser. Aus diesem Grund ist der pK_a -Wert von Proteinseitengruppen nur ein schlechtes Maß für die Protondonor- bzw. -akzeptorstärke dieser Gruppen im Protein. Es ist in diesem Zusammenhang auch

z. B. nicht richtig, zu sagen, ein äußerer Einfluß, etwa ein lokales elektrisches Feld, erhöhe oder erniedrige den pK_a -Wert einer Gruppe - was sich ändert, ist in so einem Fall immer das Protonentransfergleichgewicht in einer Wasserstoffbrücke. Für eine adäquate Beschreibung der Verhältnisse im aktiven Zentrum ist es daher notwendig, diese Gleichgewichte und ihre Empfindlichkeit gegenüber Einflüssen der Umgebung zu kennen.

Außer bei der Katalyse von chemischen Reaktionen im aktiven Zentrum von Enzymen sind Protontransferreaktionen auch bei Protonenleitungsprozessen von Bedeutung. Viele Proteine, die speziell für Energieumwandlung und -nutzung zuständig sind, sind integrale Membranproteine und ihre Aufgabe besteht darin, entweder Protonen zu transportieren - etwa unter Nutzung von Licht- oder chemischer Energie - und so einen elektrochemischen Gradienten aufzubauen, oder einen solchen Gradienten zu nutzen, um einen anderen Prozeß anzutreiben, z. B. die ATP-Synthese durch die H^+ -ATPase in Mitochondrien-, Chloroplasten- und Bakterienmembran. Da die Lipiddoppelschicht der biologischen Membran ca. 45-60 Å dick ist, müssen Protonen über diese auf molekularer Ebene recht großen Distanzen transportiert werden, was nur über spezielle Protonenkanäle oder -leiter möglich ist. Ein solcher Protonenleiter wird wohl i. a. durch eine Kette von Wasserstoffbrücken gebildet, die große Protonenpolarisierbarkeit aufweisen muß. Relativ geringe Feldänderungen vermögen dann einen raschen Transport einer positiven Ladung über eine große Distanz zu induzieren, bei dem die Protonen in den Brücken jedoch nur geringfügig verschoben werden. Eine detaillierte Darstellung der Mechanismen der Protonenleitung wird in den Kapiteln 5.2 und 5.3 gegeben.

Die Eigenschaften all dieser Systeme lassen sich an den Proteinen selbst i. a. nicht unmittelbar studieren, da dort einzelne Brücken nicht isoliert betrachtet werden können. In den Elektronendichtekarten der Röntgenstrukturanalyse sind die Protonen nicht unmittelbar sichtbar, so daß auch auf diese Weise die Lage der Gleichgewichte i. a. nicht bestimmt werden kann. Unter gewissen Bedingungen lassen sich Veränderungen an einzelnen Gruppen etwa im Verlauf einer Reaktion spektroskopisch beobachten, aber auch hieraus resultieren i. a. keine Aussagen über Gleichgewichte und Polarisierbarkeiten.

Aus diesen Gründen ist man in vielen Fällen auf die Untersuchung von einfachen Modellsystemen beschränkt. Ein Modellsystem soll dabei so genau wie möglich die Verhältnisse im Protein wiedergeben, d. h. man verwendet Moleküle oder Gruppen, die weitestgehende chemische Ähnlichkeit mit den entsprechenden Gruppen - etwa Aminosäureseitenketten - im Protein aufweisen und untersucht sie in einem wenig polaren Medium. Dennoch bleiben immer wesentliche Unterschiede zwischen dem Modellsystem und dem entsprechenden System im Protein bestehen. So gibt es in vielen Fällen im Protein eine spezifische Wechselwirkung mit der Umgebung, die im Modell nicht nachzuvollziehen ist, ebenso ist die Dielektrizitätskonstante im Protein nicht isotrop. Ein weiterer Unterschied zwischen Modell und Protein ist die unterschiedliche Beweglichkeit von Gruppen in der Umgebung einer Wasserstoffbrücke, die das dynamische Verhalten des Protons in der Brücke beeinflusst.

All diese Abweichungen sind bei einer Übertragung von an Modellsystemen gewonnenen Ergebnissen auf das reale biologische System zu berücksichtigen. Die Daten, die aus der Untersuchung von Modellsystemen gewonnen werden, können dabei als Referenzwerte betrachtet werden, sie sind gültig, sofern im Protein dieselben Bedingungen vorliegen wie im Modell, bei Abweichungen sind diese veränderten Bedingungen als Störungen einzubeziehen. Andererseits lassen beobachtete Abweichungen vom Verhalten, das nach Untersuchungen an Modellsystemen zu erwarten wäre, Schlüsse auf eine veränderte Umgebung zu.

So liegt etwa das Protonentransfergleichgewicht in einer Wasserstoffbrücke zwischen Aspartat und Retinal-Schiffbase nach den Untersuchungen am Modellsystem weitgehend auf seiten der unpolaren Grenzstruktur, d. h. die Schiffbase sollte deprotoniert sein (s. Kap. 4.6). Aus der Beobachtung, daß die Schiffbase in Bakteriorhodopsin jedoch protoniert vorliegt, läßt sich auf einen Umgebungseinfluß schließen, der das Protonentransfergleichgewicht entsprechend verschiebt - was in diesem Fall infolge der großen Protonenpolarisierbarkeit der Aspartat-Schiffbase-Brücke leicht möglich wäre. Eine solche Verschiebung des Gleichgewichts könnte in diesem Fall durch die negative Ladung in der Nähe des Cyclohexenrings der Retinal-Schiffbase induziert werden (s. Kap. 2.4 und 6.2).

4 Experimentelle Untersuchungen

4.1 Überblick

Wie in Kap. 2.4 dargelegt, findet man im aktiven Zentrum von Bakteriorhodopsin mindestens folgende Gruppen:

1. eine Retinal-Schiffbase zu Lys²¹⁶,
2. einen Tyrosinrest (wahrscheinlich Tyr²⁶) und
3. eine Carboxylatgruppe (wahrscheinlich Asp²¹²).

Eine weitere Carboxylatgruppe dürfte sich in der Nähe des Cyclohexenrings befinden (s. Kap. 2.4).

Zwischen diesen Gruppen können sich folgende Wasserstoffbrücken ausbilden:

1. Tyrosin - Retinal-Schiffbase,
2. Carbonsäure - Retinal-Schiffbase,
3. Tyrosin - Carboxylat.

Für diese Brücken bieten sich als Modellsysteme an:

1. substituierte Phenole + Butylamin-Retinal-Schiffbase (ArOH + BuNRet),
2. Carbonsäuren + Butylamin-Retinal-Schiffbase (AcOH + BuNRet),
3. substituierte Phenole + Tetrabutylammoniumacetat (ArOH + ⁻OAc).

Die genannten Systeme wurden in Tetrachlorkohlenstoff als Lösungsmittel untersucht. CCl_4 zeichnet sich dabei durch folgende vorteilhafte Eigenschaften aus:

1. niedrige Dielektrizitätskonstante (2.24), entspricht etwa der im Inneren von Membranproteinen zu erwartenden,
2. keine spezifische Wechselwirkung zwischen Solvensmolekülen und den zu untersuchenden Gruppierungen, wie sie etwa bei Chloroform auftreten,
3. gute Löslichkeit der interessierenden Substanzen,
4. gute IR-Durchlässigkeit: Praktisch im gesamten Wellenzahlbereich lassen sich auch bei hohen Schichtdicken ($\sim 500 \mu\text{m}$) einwandfreie Spektren erhalten. Dabei können in einem schmalen Bereich bei 1550 cm^{-1} zwar Spektren aufgenommen werden, eine quantitative Auswertung ist hier jedoch ausgeschlossen. Nur im Bereich 900 bis 800 cm^{-1} ist die Durchlässigkeit so stark reduziert, daß keine spektrale Information erhalten werden kann.

Es wurden die Wasserstoffbrückenbildungs- und Protontransfergleichgewichte bestimmt in Abhängigkeit von

1. der Azidität des Protondonors (durch Variation der Substituenten),
2. der Temperatur.

Die Meßergebnisse erlauben die Charakterisierung der Systeme im Hinblick auf die thermodynamischen Parameter ΔH° und ΔS° für Brückenbildung und Protontransfer. Wo die Daten für das der Brücke im Protein entsprechende Modellsystem (p-Kresol für Tyrosin) nicht unmittelbar zugänglich sind, ist eine Extrapolation aus den anhand der anderen Systeme der Familie erhaltenen Daten möglich (s. Kap. 4.5 und 4.7).

Dr. P.P. Rastogi aus Indien führte 1979/80 erste Arbeiten an den Systemen Phenole + Schiffbase aus, die auch veröffentlicht wurden [236]. Er begann 1983 im Rahmen eines dreimonatigen Forschungsaufenthalts mit der Bestimmung der thermodynamischen Parameter dieser Systeme, die dann von mir fortgeführt wurde.

Erste Untersuchungen an den Systemen Phenole + Acetat wurden ebenfalls bereits veröffentlicht [237]. Eine weitere Bearbeitung des Problems erfolgte durch Ulrike Tangermann, die in ihrer Diplomarbeit die thermodynamischen Parameter dieser Systeme bestimmte [238]. Die von ihr erhaltenen Daten werden in vorliegender Arbeit diskutiert.

4.2 Verwendete Substanzen

Substanz		Qualität	Herkunft
Tetrachlorkohlenstoff	CCl_4	Uvasol	Merck
Methylenchlorid	CH_2Cl_2	Uvasol	Merck
Butylchlorid		Uvasol	Merck
Ethanol		abs. p. a.	Merck
n-Pentan		p. s.	Merck
Pentachlorphenol	PCP	99 %	Fluka
2,4,6-Trichlorphenol	2,4,6-TCP	99 %	Fluka
2,3,5-Trichlorphenol	2,4,5-TCP	97 %	Ega
p-Kresol		99 %	Ega
Trifluoressigsäure	TFA	Uvasol	Merck
Dichloressigsäure	DCA	puriss.	Fluka
Methoxyessigsäure	MOA	puriss.	Fluka
Monochloressigsäure	MCA	puriss.	Fluka
Essigsäure 100 %	AcOH	p. a.	Merck
TFA-Anhydrid		99 %	Ega
Tetrabutylammoniumacetat	TBAA	p. a.	Ega
Retinal		p. s.	Fluka
Butylamin	BuNH_2	p. s.	Merck
Salzsäure, 0.1 N in			
Isopropanol	HCl		Merck
Phosphorpentoxid			Merck
Molekularsieb 4 A			Merck

Synthesen

Butylamin-Retinal-Schiffbase (nach [239])

5 ml reines Butylamin wird über Nacht über Molekularsieb 4 Å getrocknet. Die folgenden Arbeiten werden unter weitestgehendem Ausschluß von Licht (Umwickeln der Kolben mit Aluminiumfolie) und Luft (Umfüllen im Stickstoffstrom, Belüften z. B. des Rotationsverdampfers mit Stickstoff) ausgeführt. Zugabe von 1 g Retinal ergibt eine gelbe Lösung. Nach Abgießen vom Molekularsieb wird überschüssiges Amin am Rotationsverdampfer abgezogen. Das zurückbleibende Oel wird zur Entfernung von restlichem Wasser dreimal in je 3 ml Ethanol aufgenommen und das Lösungsmittel anschließend abrotiert. Zurück bleibt eine rote, ölige Substanz, die bei Abkühlung im Gefrierschrank kristallisiert, sich jedoch bei Raumtemperatur infolge von Verunreinigungen wieder verflüssigt.

Da die Schiffbase bei Raumtemperatur in praktisch allen Lösungsmitteln sehr gut löslich ist, muß sie bei tiefer Temperatur (Trockeneis in Aceton: -86°) umkristallisiert werden. Das Oel wird in möglichst wenig (ca. 1 ml) Pentan aufgenommen und die entstehende Lösung im verschlossenen Kolben in das Kältebad gebracht. Zur Kristallisation sind i. a. Impfkristalle notwendig, die sich leicht im Kolben erzeugen lassen, indem man einzelne Tropfen der Lösung an der Kolbenwandung eintrocknen läßt. Bringt man die so entstandenen Kriställchen in die Lösung, so bilden sich nach und nach zahlreiche gelbe Nadeln. Die überstehende Flüssigkeit wird - im starken Stickstoffstrom, um Einkondensieren von Wasser zu vermeiden - mit einer Pasteur-Pipette abgesaugt. (Eine Filtration wäre bei der tiefen Temperatur nur mit erheblichem Aufwand möglich.) Da der Reinigungseffekt infolge der ungenügenden Abtrennung der überstehenden Lösung nicht allzu gut ist, ist das Umkristallisieren noch zweimal zu wiederholen.

Die Kristalle werden über Nacht an der Oelpumpe mit vorgeschalteter Zeolithfalle getrocknet.

Schmelzpunkt: 59°C (Lit. [239]: 59 bis 60°C),

Hydrochlorid der Butylamin-Retinal-Schiffbase

1 g der Retinal-Schiffbase wird in 40 ml 0.1 N HCl in Isopropanol aufgenommen. Es bildet sich eine rote Lösung. Der nach dem Abziehen des Lösungsmittels zurückbleibende orangefarbene Feststoff wird zur Reinigung in wenig Methylenchlorid gelöst und durch langsame Zugabe von Butylchlorid ausgefällt. Der Niederschlag wird abgesaugt und an der Ölpumpe getrocknet.

Reinigung und Trocknung

Die Phenole (außer dem nichtflüchtigen PCP) wurden vor der Verwendung sublimiert. Eine zusätzliche Trocknung erfolgte über Phosphorpentoxid im Exsikkator (12 Std.).

MCA und DCA wurden zur Reinigung destilliert. TFA wurde durch Zugabe von einigen Tropfen TFA-Anhydrid wasserfrei gemacht [200].

Die übrigen Substanzen wurden ohne weitere Reinigung verwendet.

Herstellung der Lösungen

Es wurde eine gewisse Menge (i. a. ungefähr soviel, wie für 5 ml Lösung nötig war) der Substanz in einem Gläschen genau eingewogen. Anschließend wurde mit einer Meßpipette soviel Lösungsmittel zugegeben, daß die gewünschte Endkonzentration erreicht war. Zur Herstellung der Mischlösungen wurden zuerst Lösungen der Komponenten mit dem Doppelten der gewünschten Endkonzentration hergestellt. Durch Zusammengeben zweier gleicher Volumina (i. a. je 1 ml), die mit einer Eppendorf-Pipette abgemessen wurden, wurde die beabsichtigte Konzentration der Mischung erreicht.

pK_a-Werte

PCP	4.74 [240]	TFA	0.22 [241]
2,4,6-TCP	5.99 [240]	DCA	1.30 [241]
2,3,5-TCP	6.43 [240]	MCA	2.86 [241]
p-Kresol	10.18 [240]	MOA	3.57 [241]
		AcOH	4.76 [241]
BuNRet	5.99 [163]		

4.3 Meßtechnik

Spektrometer

Die Aufnahme der IR-Spektren erfolgte mit einem Doppelstrahl-Gitterspektrometer Modell 325 der Fa. Bodenseewerk Perkin-Elmer, Überlingen. Wasserdampf und Kohlendioxid, deren Absorptionen zu Energieverlusten und Inkompensationen führen können, wurden durch eine Trockenluftspülung aus dem Gerät entfernt. Durch den Betrieb mit *gekreuzten Choppern* wurde die thermische Emission der Proben aus den Messungen eliminiert.

Die Spektren wurden mit größtmöglicher Spaltbreite (Spaltprogramm 8) aufgenommen, um trotz der hohen Reflexionsverluste an den Silicium-Fenstern einen hohen Energiedurchsatz zu ermöglichen. Auf die Qualität der Spektren ist dies praktisch ohne Einfluß, da die Breite der Banden in den untersuchten flüssigen Proben in jedem Fall deutlich über der durch die Spaltbreite bedingten optischen Auflösung liegt.

Zusätzlich zur unmittelbaren Aufzeichnung der Spektren durch den Schreiber des Spektrometers, wurden die Spektren über ein Mikrocomputersystem digitalisiert und auf 8-Kanal-Lochstreifen übertragen (Einzelheiten in der Diplomarbeit von R. Krämer [211]). Dies ermöglichte die Übertragung der Spektren auf den Großrechner des Leibniz-Rechenzentrums und die Computerauswertung der Daten.

Küvettenteknik

Als Probenküvette fand die in [242] beschriebene Flüssigkeitsküvette Verwendung. Die für quantitative Messungen erforderliche hohe Schichtdickengenauigkeit und -reproduzierbarkeit wird bei dieser Küvette dadurch erreicht, daß in eines der beiden Fenster eine Vertiefung zur Aufnahme der Probe eingeschliffen ist. Als *Fenstermaterial* wurde Silicium verwendet, da

es praktisch nicht verformbar und unempfindlich auch gegenüber aggressiven Lösungen ist und relativ gute Durchlässigkeit praktisch im gesamten IR-Spektralbereich - mit Ausnahme eines schmalen Bereichs bei 600 cm^{-1} - aufweist.

Durch den hohen Brechungsindex des Siliciums treten an den Grenzflächen der Fenster jedoch hohe Reflexionsverluste auf, so daß sich der Energiedurchsatz entsprechend verringert. Darüberhinaus kann es an planparallelen Grenzschichten infolge der Reflexionen zu Interferenzerscheinungen kommen, die sich im Spektrum als eine dem eigentlichen Probenspektrum überlagerte wellenartige Absorption äußern. Um diese zu vermeiden, muß der Probenraum, der in eines der Fenster eingeschiffen ist, einen keilförmigen Querschnitt aufweisen.

Alle im Rahmen dieser Arbeit aufgezeichneten Spektren wurden mit ein und demselben Fensterpaar aufgenommen; die mittlere Schichtdicke des Probenraums betrug $528\text{ }\mu\text{m}$.

Zur Eliminierung von Banden des Fenstermaterials und des Lösungsmittels diente eine mit dem reinen Solvens gefüllte Referenzküvette im Vergleichsstrahl des Spektrometers (Beschreibung in [242]). Diese Küvette ermöglicht die Einstellung der Schichtdicke und geringfügiges Kippen eines der beiden Fenster, so daß ein Probenraum mit weitgehend derselben Charakteristik wie der der Probenküvette erzeugt werden kann.

Für die Messungen in Abhängigkeit von der Temperatur wurde die Probenküvette thermostatisiert. Dies erfolgt durch ein Kupferrohr, das auf den Küvettenkörper aufgeschraubt ist und von Kühlmittel durchflossen wird. Der Wärmeübergang zwischen Kupferaufsatz und Küvette wird durch Wärmeleitpaste erhöht. Für die Thermostatisierung wurde ein Umwälzthermostat der Fa. Haake, Typ KT33 verwendet. Zwischen Kühlmittel und Probe stellt sich i. a. ein Temperaturgefälle ein, das mehr als 10 K betragen kann, so daß die Temperatur möglichst nahe an der Probe gemessen werden muß. Dazu diente ein PT-100-Widerstandsthermometer, das in eine Bohrung im Küvettenkörper eingeführt wird, mit einem entsprechenden Meßwandler [211].

Bandenauswertung

Allgemein gilt für den Zusammenhang zwischen Konzentration einer Substanz, Schichtdicke und optischer Absorption das Lambert-Beer-Gesetz

$$I/I_0 = \exp(-k \cdot c \cdot d)$$

mit I: gemessene Intensität,
I₀: Referenzintensität,
c: Konzentration,
d: Schichtdicke,
k: Konstante.

I/I₀ wird dabei auch als Transmission T bezeichnet. Der dekadische Logarithmus von 1/T wird als Extinktion E bezeichnet; nach dieser Definition ergibt sich

$$E = \lg (I_0/I) = \varepsilon \cdot c \cdot d.$$

ε ist der sog. Extinktionskoeffizient, der spezifisch für den untersuchten Stoff und wellenzahlabhängig ist.

Bei einem keilförmigen Probenraum (s. o.) gilt dieses Gesetz nicht mehr streng, so daß eine entsprechende Korrektur durchgeführt werden muß. Dazu wurden die gemessenen Extinktionswerte unmittelbar nach dem Einlesen der auf Lochstreifen aufgezeichneten Spektren am Großrechner mit einer empirischen Korrekturfunktion multipliziert [211]. Die Aufstellung der Korrekturfunktion erfolgt nach einer Eichung an Benzollösungen verschiedener Konzentration bei bekanntem Extinktionskoeffizienten [200].

Um die Konzentration der interessierenden Spezies zu bestimmen, muß die Extinktion charakteristischer Banden dieser Spezies ermittelt werden. Bei bekanntem Extinktionskoeffizienten ε und bekannter Schichtdicke d berechnet sich die Konzentration zu

$$c = E / \varepsilon \cdot d.$$

Der Extinktionskoeffizient ist dabei für jede auszuwertende Bande anhand von Eichmessungen zu bestimmen. Genaue Ergeb-

nisse erhält man jedoch nur, wenn man nicht die einfache Extinktion auswertet, d. h. die Extinktion bei einem bestimmten Wellenzahlwert, etwa am Absorptionsmaximum der Bande, sondern die integrale Extinktion der Bande, d. h. die Fläche unter dem gesamten Bandenprofil, da dadurch Änderungen in der Bandenform nicht zu einer Verfälschung des Meßergebnisses führen.

In einfachen Fällen - z. B. bei der ziemlich freistehenden OH-Valenzschwingung nicht wasserstoffverbrückter Phenole - ist diese Bestimmung nach einem einfachen Näherungsverfahren (Integration nach Simpson) möglich. Sie erfolgte durch ein FORTRAN-Programm [211].

In Fällen, in denen sich mehrere Banden überlagern, ist es nötig, die einzelnen Bandenprofile durch eine Bandentrennung zu ermitteln. Dazu diente ein von G. Albrecht erstelltes und von R. Krämer erweitertes Programm, das für jede Bande die fünf Parameter eines Cauchy-Profiles

$$E(\tilde{\nu}) = p_1 \cdot \exp(-p_3^2 \cdot (\tilde{\nu} - p_2)^2) + p_5 / (1 + p_4^2 \cdot (\tilde{\nu} - p_2)^2)$$

so anpaßt, daß die Summe der Fehlerquadrate minimiert wird [243][211]. Aus den so erhaltenen Parametern lassen sich die einzelnen Banden des Bandenkomplexes rekonstruieren und ihre integralen Extinktionen berechnen.

Kontinuum

Um eine Information über die Protonenpolarisierbarkeit der Wasserstoffbrücken zu erhalten, wurde auch die kontinuierliche Absorption in den untersuchten Systemen ermittelt. Dazu wurde die Extinktion im bandenfreien Bereich bei ca. 2000 cm⁻¹ gemessen und durch Division durch die Komplexkonzentration (s. Kap. 4.4 bis 4.6) und die Schichtdicke der Extinktionskoeffizient der kontinuierlichen Absorption bestimmt.

4.4 Auswertung

Spezies, Gleichgewichte, thermodynamische Parameter

Wie in Kap. 4.3 ausgeführt, können aus den integralen Intensitäten einzelner Banden die Konzentrationen der interessierenden Spezies ermittelt werden. Die in den betrachteten Systemen möglichen Speziestypen sind in Tab. 4.4.1 aufgelistet. In Tab. 4.4.2 sind die zwischen ihnen möglichen Gleichgewichte gezeigt. In vorliegender Arbeit wurden jedoch die Dissoziations-

Formel	Abkürzung	Erläuterung
R-OH	AH oder M	freie Säure (Phenol oder monomere Carbonsäure)
BuNRet	B	freie Base (Butylamin-Retinal-Schiffbase)
AH...B	N	unpolare Grenzstruktur der Wasserstoffbrücke
A ⁻ ...HB ⁺	P	polare Grenzstruktur
A ⁻		freies Anion der Säure (Phenolat oder Carboxylat)
HB ⁺		freie protonierte Base

Tab. 4.4.1: Mögliche Speziestypen in den untersuchten Systemen (für Phenol + Acetat s. Kap. 4.7).

gleichgewichte nicht berücksichtigt, da - wie durch Leitfähigkeitsmessungen gezeigt werden konnte [200] - die entsprechenden Gleichgewichtskonstanten i. a. so gering sind, daß die freien ionischen Spezies A⁻ und HB⁺ nicht in nennenswerter Konzentration vorhanden sind.

Für die Gleichgewichtskonstanten gilt ganz allgemein:

$$\Delta G^\circ = -R \cdot T \cdot \ln K \quad \text{bzw.} \quad \Delta H^\circ - T \cdot \Delta S^\circ = -R \cdot T \cdot \ln K.$$

Gleichgewicht	Gleichgewichtskonst.	Bezeichnung
$AH + B \rightleftharpoons AH \cdots B$	$K_b = [N]/([AH] \cdot [B])$	Brückenbildung
$AH \cdots B \rightleftharpoons A^- \cdots HB^+$	$K_{pt} = [P]/[N]$	Protontransfer
$A^- \cdots HB^+ \rightleftharpoons A^- + HB^+$	$K_{dis} = [A^-] \cdot [HB^+]/[P]$	Dissoziation

Tab. 4.4.2: Gleichgewichte in den untersuchten Systemen.

Umformung liefert die Gleichung von van't Hoff:

$$\ln K = -\Delta H^\circ/R \cdot T + \Delta S^\circ/R,$$

die zeigt, daß sich bei einer Auftragung von $\ln K$ gegen $1/T$ - unter der Voraussetzung, daß ΔH° und ΔS° temperaturunabhängig sind - eine Gerade mit der Steigung $-\Delta H^\circ/R$ und dem Achsenabschnitt $\Delta S^\circ/R$ ergibt. Auf diese Weise können die thermodynamischen Parameter ΔH° und ΔS° bestimmt werden.

Wird für eine gegebene Temperatur (i. a. Raumtemperatur) die Azidität des Protondonors durch Variation von Substituenten verändert, so gilt für das Protontransferegleichgewicht die Gleichung von Huyskens [207] (s. Kap. 3.1):

$$\lg K_{pt} = \xi \cdot \Delta pK_a - \delta,$$

wobei ξ und δ für die jeweilige Systemfamilie charakteristische Konstanten sind. In diesem Fall ergibt die Auftragung von $\lg K_{pt}$ gegen ΔpK_a - der Differenz zwischen pK_a des protonierten Protonakzeptors und pK_a des Protondonors - eine Gerade mit der Steigung ξ und dem Achsenabschnitt $-\delta$.

Steigung und Achsenabschnitt lassen sich leicht durch lineare Regression nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate bestimmen. Die Ermittlung der thermodynamischen Parameter in den Systemen Phenole + Schiffbase erfolgten mit einem PASCAL-Programm, das als Eingabedaten die integralen Intensitäten der OH-Valenzschwingung des Phenols (zur Bestimmung der Komplexkonzentration) und der C=N-Valenzschwingung der protonierten Schiffbase erwartet und daraus die Parameter für

Brückenbildung und Protontransfer berechnet.

Eine genaue Bestimmung von ΔH° und ΔS° ist nur in einem gewissen Bereich dieser Größen möglich. Voraussetzung für eine solche Bestimmung ist ja, daß sich die Meßgrößen, d. h. die Konzentrationen der interessierenden Spezies, mit der Temperatur in ausreichendem Maße ändern. Für das Protontransfergleichgewicht kann man als Meßgröße auch die relative Konzentration der polaren Grenzstruktur (auch einfach als Protontransfer bezeichnet und oft in % angegeben) ansehen:

$$PT = [P]/([P] + [N]) \quad \text{bzw.} \quad PT = K_{pt}/(1 + K_{pt})$$

Von R. Krämer [211] wurden theoretische Graphen für PT in Abhängigkeit von ΔH_{pt}° und ΔS_{pt}° - unter der Voraussetzung, daß diese Größen temperaturunabhängig sind - erstellt (Abb. 4.4.1), die die zu erwartenden Konzentrationsänderungen für verschiedene Werte von ΔH_{pt}° und ΔS_{pt}° zeigen. Der untersuchte Temperaturbereich liegt bei ca. 260 bis 310 K. Man sieht (Abb. 4.4.1a), daß die Genauigkeit der Messungen auch von ΔS_{pt}° beeinflusst wird, obwohl dieses in der van't-Hoff-Gleichung nicht erscheint.

Abb. 4.4.1 zeigt darüberhinaus, daß die Bestimmung der thermodynamischen Parameter auch bei sehr kleinen oder sehr großen Gleichgewichtskonstanten ungenau wird, also etwa bei sehr geringem oder sehr großem Protontransfer; Analoges gilt für die Bestimmung der Parameter der Brückenbildung, die etwa bei sehr starker Assoziation nicht mehr genau bestimmt werden können. Im Extremfall muß hier auf eine Bestimmung verzichtet werden (Assoziation im System p-Kresol + Acetat, s. Kap. 4.7). Bei den Protontransfergleichgewichten können die Werte näherungsweise durch Extrapolation ermittelt werden (s. Kap. 4.5 und 4.7).

Es erschien mir zweckmäßig, bei den ungeladenen Brücken zwischen der Ausbildung der Wasserstoffbrücken und der Komplexbildung zu unterscheiden. Hierbei wird unter der Brückenbildung nur das Gleichgewicht K_b zwischen den freien Partnern und der *unpolaren Grenzstruktur* des wasserstoffverbrückten Komplexes verstanden (s. Tab. 4.4.2). Hierauf hat die Lage des Protontransfergleichgewichts keinen Einfluß, während in die Komplexbildungskonstante (auch als Assoziationskonstante bezeichnet [206])

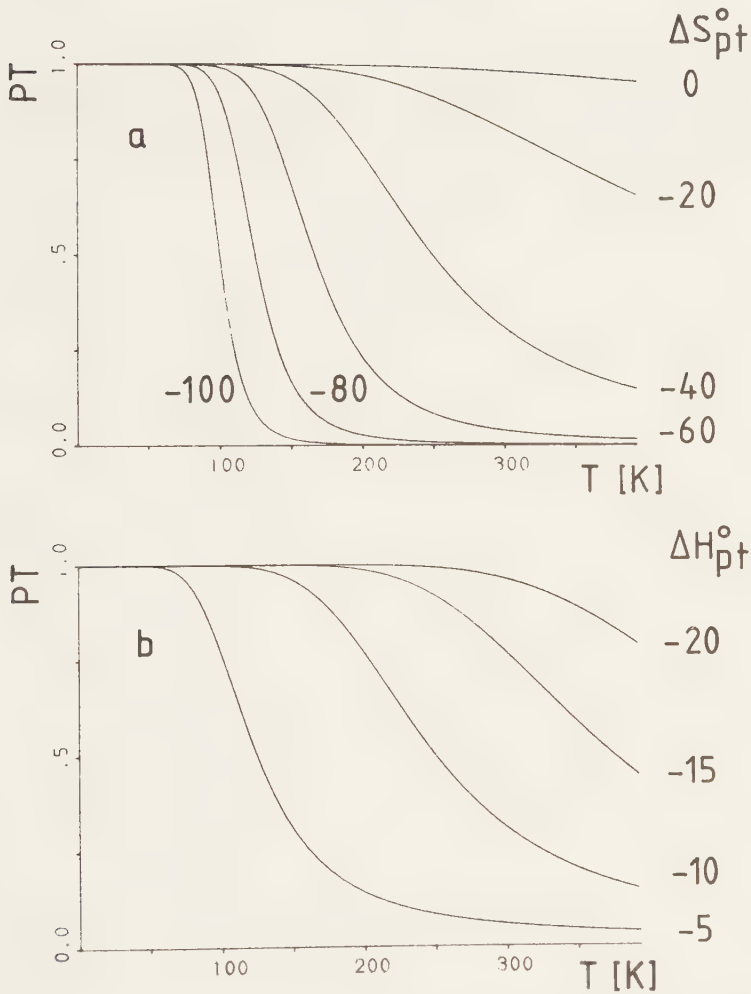


Abb. 4.4.1: Abhängigkeit des Protontransfers von der Temperatur (nach [211]).

a) $\Delta H_{pt}^\circ = -10$ kJ/Mol; ΔS_{pt}° variiert, Werte in J/Mol·K.

b) $\Delta S_{pt}^\circ = -40$ J/Mol·K; ΔH_{pt}° variiert, Werte in kJ/Mol.

$$K_c = ([N] + [P]) / ([AH] \cdot [B])$$

der Protontransfer mit eingeht, d. h. je größer der Protontransfer, desto größer wird auch K_c sein, da die polare Grenzstruktur eine extrem hohe Stabilität aufweist. Bei geringem Protontransfer sind beide Werte (K_b und K_c) praktisch gleich.

4.5 Phenol + Retinal-Schiffbase

In diesem System sind folgende Gleichgewichte von Bedeutung:



mit AH: substituiertes Phenol,
 B: Butylamin-Retinal-Schiffbase
 N: unpolare und
 P: polare Grenzstruktur.

Die Gleichgewichtskonstante der Dissoziation der polaren Grenzstruktur ist i. a. so gering, daß dieses Gleichgewicht nicht be-

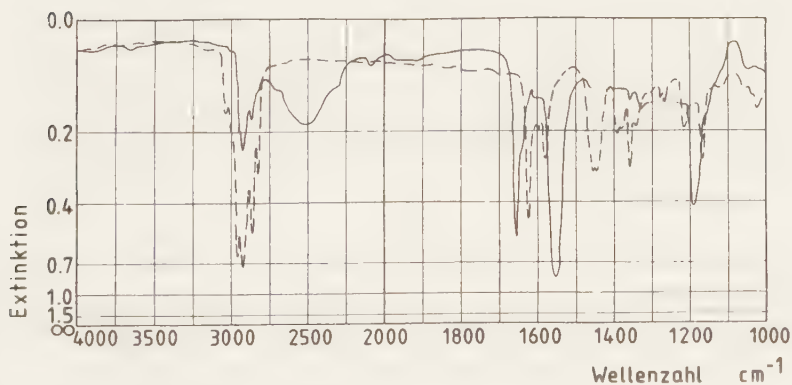


Abb. 4.5.1: IR-Spektren von

--- Butylamin-Retinal-Schiffbase (BuNRet), 30 mM in CCl_4 ,
 — BuNRet·HCl, 10 mM in CH_2Cl_2 .

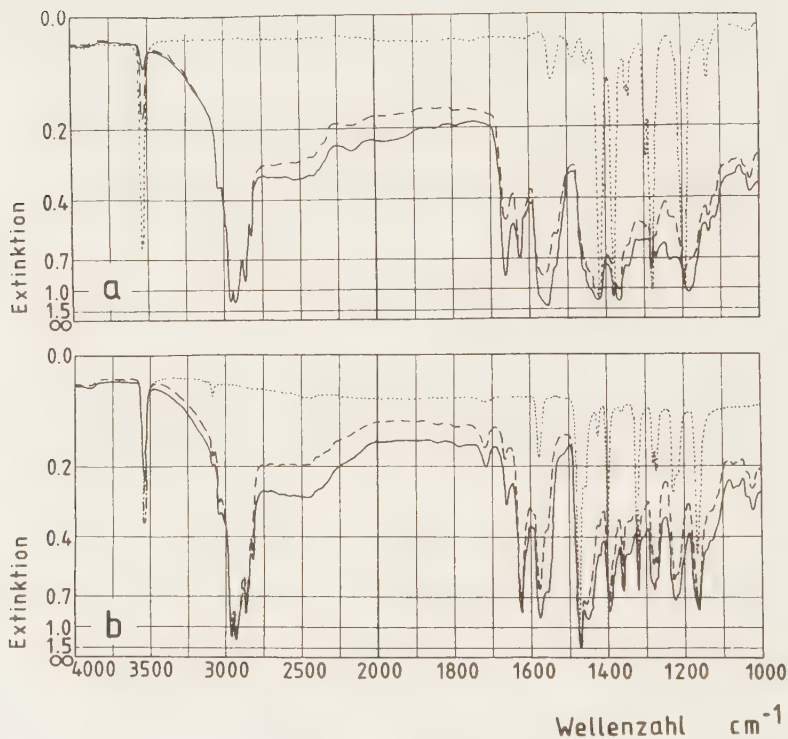


Abb. 4.5.2: IR-Spektren der Systeme Phenol + Butylamin-Retinal-Schiffbase (BuNRet) in CCl_4 .

a) Pentachlorophenol (PCP), 50 mM;

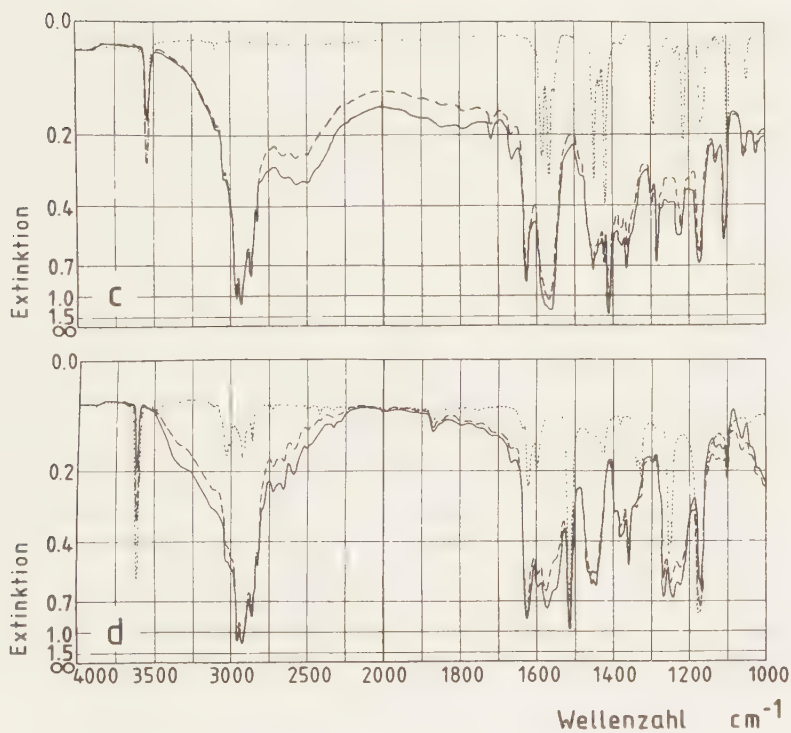
PCP + BuNRet, 60 mM:

--- 35.6 °C, — -1.0 °C.

b) 2,4,6-Trichlorophenol (2,4,6-TCP), 25 mM;

2,4,6-TCP + BuNRet, 50 mM:

--- 30.9 °C, — -3.0 °C.



c) 2,3,5-Trichlorphenol (2,3,5-TCP), 22 mM;

2,3,5-TCP + BuNRet, 50 mM:

--- 30.5 °C, — -2.0 °C.

d) p-Kresol, 50 mM;

p-Kresol + BuNRet, 50 mM:

--- 40 °C, — 0 °C.

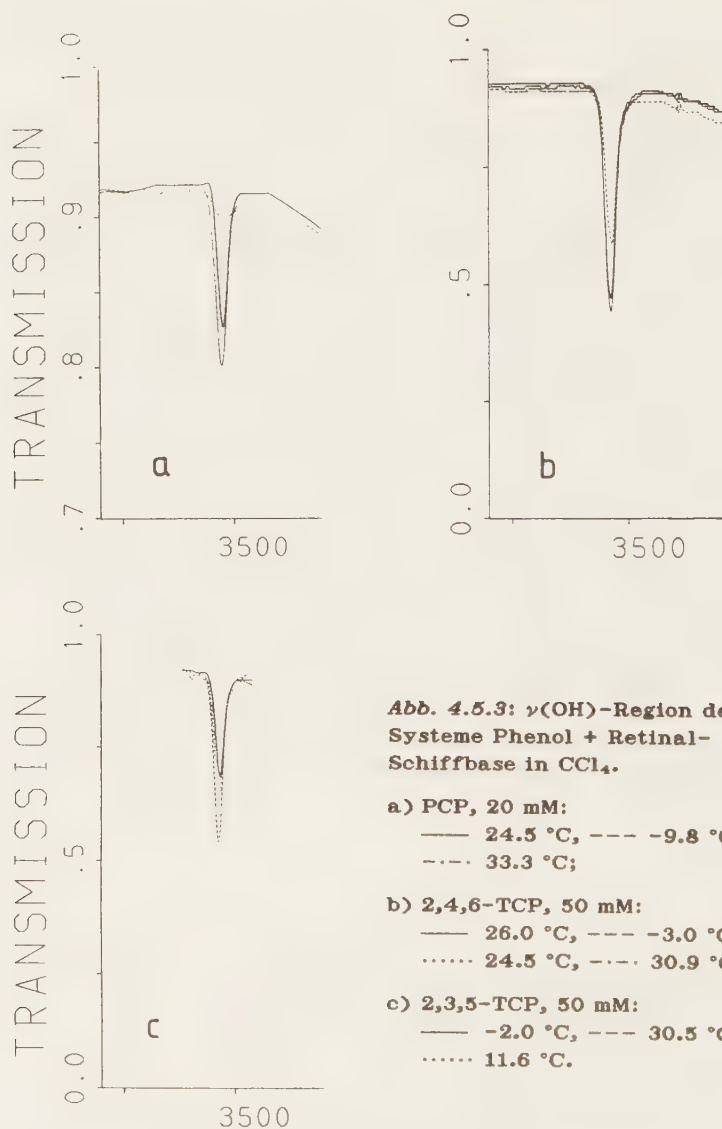


Abb. 4.5.3: $\nu(\text{OH})$ -Region der Systeme Phenol + Retinal-Schiffbase in CCl_4 .

rücksichtigt werden muß, d. h. die Konzentrationen der dissoziierten Spezies A^- und HB^+ sind zu vernachlässigen [200].

Brückenbildung

Die *Komplexkonzentration* ($[C] = [N] + [P]$) ergibt sich aus der integralen Extinktion der OH-Valenzschwingung des freien Phenols ($\nu(OH, AH)$) bei 3550 cm^{-1} und der Einwaagekonzentration $[I]$:

$$[C] = [I] - [AH] = [I] - E(\nu(OH, AH))/d \cdot \varepsilon(\nu(OH, AH)).$$

Die Extinktionskoeffizienten der OH-Valenzschwingung wurden aus den entsprechenden Extinktionen einer Lösung bekannter Konzentration des jeweiligen reinen Phenols in CCl_4 ermittelt. Bei dieser Bestimmung ist darauf zu achten, daß möglichst wenig Selbstassoziation ($2 AH \rightleftharpoons (AH)_2$) des Phenols eintritt. I. a. kommt man – anders als bei den Carbonsäuren – ohne die Bestimmung des entsprechenden Gleichgewichts aus, da die Dimerisationskonstanten der Phenole relativ klein sind. Es empfiehlt sich aber, für diese Eichmessungen bei niedrigen Konzentrationen des Phenols und etwas höheren Temperaturen zu arbeiten. (IR-Spektren s. Abb. 4.5.2.)

Aus der so erhaltenen Komplexkonzentration läßt sich die Gleichgewichtskonstante der Komplexbildung erhalten:

$$K_c = [C]/[AH]^2,$$

da die Einwaagekonzentrationen von Phenol und Schiffbase gleich und damit auch die aktuellen Konzentrationen an freiem Phenol und freier Schiffbase gleich groß sind. Zur Ermittlung der Gleichgewichtskonstante der *Brückenbildung* ist jedoch die Bestimmung der Konzentration der polaren Grenzstruktur P nötig:

$$K_b = [N]/[AH]^2, \text{ mit } [N] = [C] - [P].$$

Deren Bestimmung erfolgte wie im Abschnitt *Protontransfer* beschrieben (s. u.). Eine Auftragung von $\ln K_b$ gegen $1/T$ (van't-Hoff-Plot) ist in Abb. 4.5.4 gezeigt. Daraus wurden –

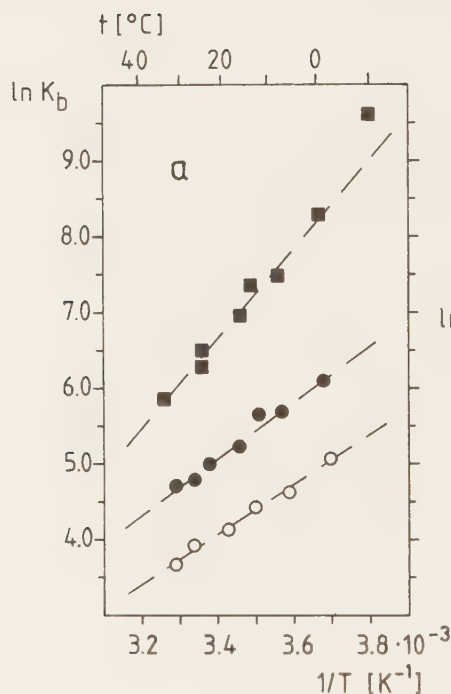
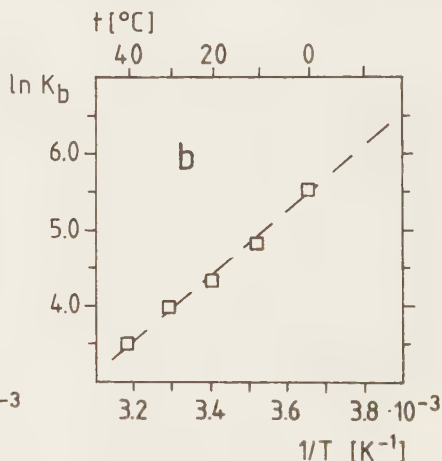


Abb. 4.5.4: van't-Hoff-Plot der Brückenbildung in den Systemen Phenol + Retinal-Schiffbase.

a) ■ PCP, ○ 2,4,6-TCP, ● 2,3,5-TCP;

b) □ p-Kresol (nach Daten von Rastogi).



Phenol	ΔH_b° [kJ/Mol]	ΔS_b° [J/Mol·K]	ΔG_b° (22 °C) [kJ/Mol]
PCP	-49.3	-112.3	-16.2
2,4,6-TCP	-27.4	-59.5	-9.8
2,3,5-TCP	-39.0	-90.7	-12.2
p-Kresol	-34.8	-82.3	-10.5

Tab. 4.5.1: Thermodynamische Parameter der Brückenbildung in den Systemen Phenol + Retinal-Schiffbase. Werte für p-Kresol von Rastogi.

wie in Kap. 4.4 näher erläutert - die in Tab. 4.5.1 zusammengefaßten thermodynamischen Daten erhalten.

Protontransfer

Die Konzentration der *polaren Grenzstruktur* läßt sich dabei aus der integralen Extinktion der C=N-Valenzschwingung der protonierten Schiffbase ($\nu(\text{C}=\text{N},\text{P})$) bei 1662 cm^{-1} ermitteln. Um diese bestimmen zu können, muß sie erst von der analogen Bande der unprotonierten Schiffbase ($\nu(\text{C}=\text{N},\text{N})$) bei 1624 cm^{-1} separiert werden. Dies geschah für das 2,4,6-Trichlorphenol-System durch das erwähnte Bandentrennprogramm; bei den beiden anderen Systemen konnten bis auf wenige Ausnahmen (s. Abb. 4.5.6) keine sinnvollen Trennungen erhalten werden, was wohl darauf zurückzuführen ist, daß die $\nu(\text{C}=\text{N},\text{N})$ an ihrem niederwellenzahligen Rand von anderen Banden überlagert wird und dort außerdem bereits Inkompensationen durch die stark absorbierende Bande des Lösungsmittels bei 1550 cm^{-1} auftreten. In diesen Fällen wurde die linke (höherwellenzahlige) Flanke der $\nu(\text{C}=\text{N},\text{N})$ mit einem kubischen Polynom (*Spline*) angenähert, d. h. das Spektrum wurde zwischen den beiden Punkten, an denen die $\nu(\text{C}=\text{N},\text{P})$ auf der $\nu(\text{C}=\text{N},\text{N})$ aufsitzt, interpoliert. Das so erhaltene Spektrum wurde anschließend vom Originalspektrum abgezogen, wobei die $\nu(\text{C}=\text{N},\text{P})$ übrigbleibt. Für Interpolation und Subtraktion fand das interaktive Programm *MENUE* von R. Krämer Verwendung [211]. (IR-Spektren s. Abb. 4.5.5; Beispiele für Bandentrennungen in Abb. 4.5.6.). Der Extinktionskoeffizient der $\nu(\text{C}=\text{N},\text{P})$ -Bande wurde anhand einer Lösung von BuNRet·HCl in CH_2Cl_2 (s. Abb. 4.5.1) bestimmt (Eichung).

Wie bei den für die Brückenbildung erhaltenen Daten wurde auch hier eine Auftragung nach der van't-Hoff-Gleichung erstellt (Abb. 4.5.7). Die gute Linearität der Beziehung zwischen $\ln K_{\text{pt}}$ und $1/T$ zeigt, daß $\Delta H_{\text{pt}}^\circ$ und $\Delta S_{\text{pt}}^\circ$ im betrachteten Temperaturbereich weitgehend temperaturunabhängig sind. Besonders beim 2,3,5-Trichlorphenol-System werden aber auch die Grenzen der Methode deutlich: Die hier zu beobachtenden Änderungen im Protontransfer - d. h. der Konzentrationen der unpolaren und polaren Spezies - sind bereits so gering (s. rechte Skala in Abb. 4.5.6), daß die Bestimmung von K_{pt} nicht mehr so genau ist und erhebliche Abweichungen von der Geraden auftreten. Durch lineare Regression lassen sich dennoch sinnvolle

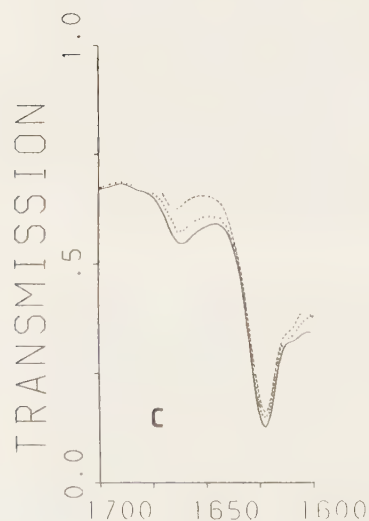
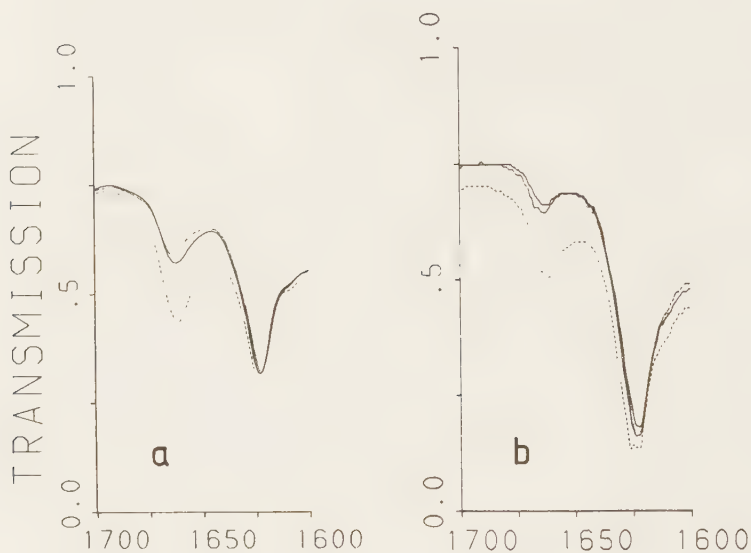


Abb. 4.5.5: $\nu(\text{C}=\text{N})$ -Region der Systeme Phenol + Retinal-Schiffbase in CCl_4 .

- a) PCP, 20 mM:**
 — 24.5 °C, --- -9.8 °C,
 - · - 33.3 °C;
- b) 2,4,6-TCP, 50 mM:**
 — 26.0 °C, --- -3.0 °C,
 · · · · 24.5 °C, - · - 30.9 °C;
- c) 2,3,5-TCP, 50 mM:**
 — -2.0 °C, --- 30.5 °C,
 · · · · 11.6 °C.

WELLENZAHL $1/\text{CM}$

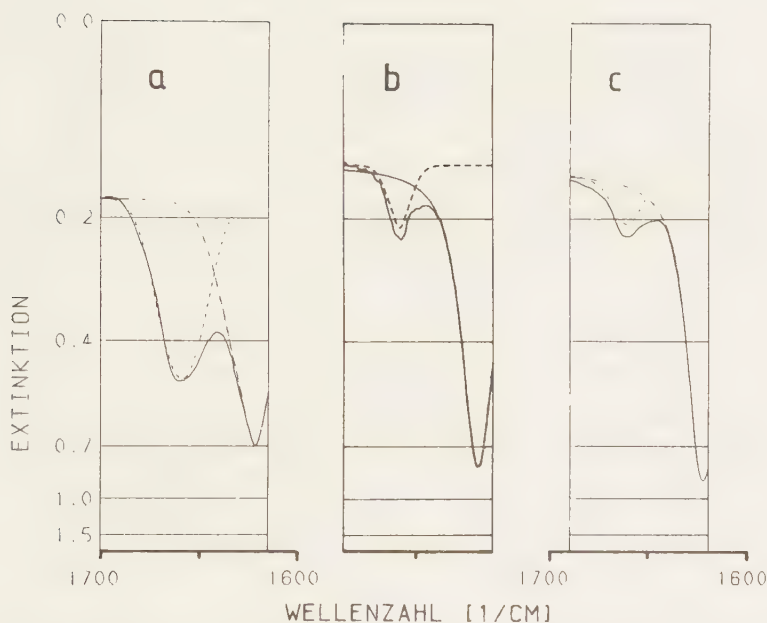


Abb. 4.5.6: Beispiele für Bandentrennungen bei den Systemen Phenol + Retinal-Schiffbase in CCl_4 .

— Gemessenes Spektrum,
 --- $\nu(\text{C}=\text{N},\text{P})$, - · - · $\nu(\text{C}=\text{N},\text{N})$.

- a) PCP, 60 mM, 35.6 °C,
- b) 2,4,6-TCP, 50 mM, 18.5 °C,
- c) 2,3,5-TCP, 50 mM, 7.0 °C.

Werte für die thermodynamischen Parameter erhalten (Tab. 4.5.2).

Die Werte für das p-Kresol-System wurden dabei wie folgt durch Extrapolation aus den anderen Daten erhalten:

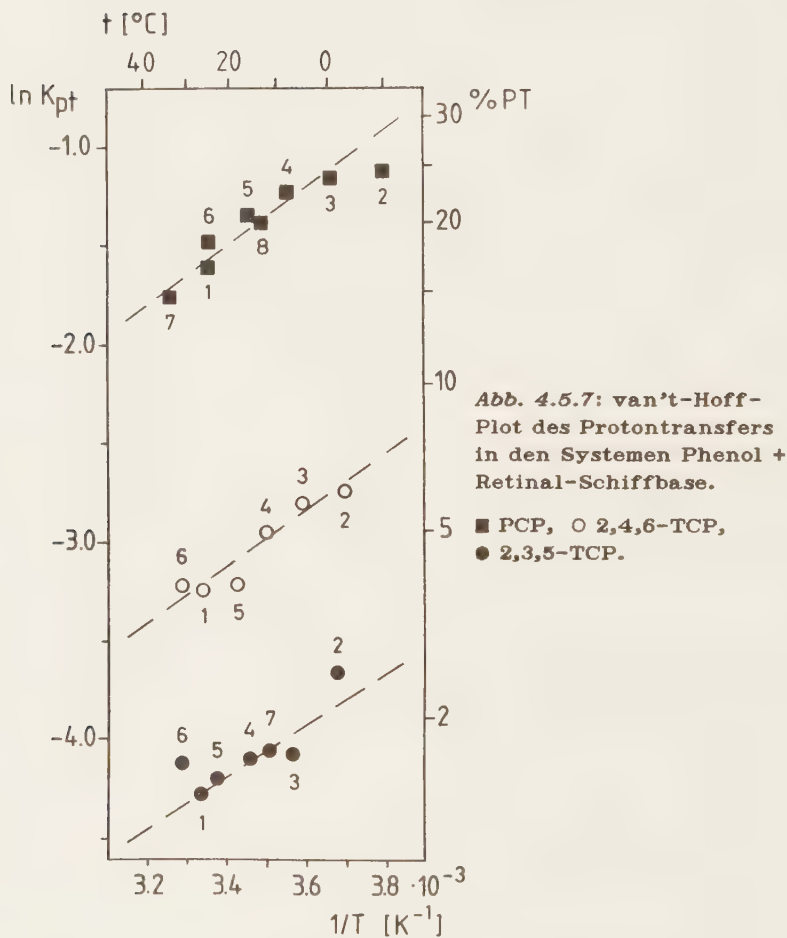


Abb. 4.5.7: van't-Hoff-Plot des Protontransfers in den Systemen Phenol + Retinal-Schiffbase.

Das System *p*-Kresol + Schiffbase

In diesem System, das dem interessierenden Wasserstoffbrückenkomplex zwischen Tyrosin und Retinal-Schiffbase entspricht, liegt der Protontransfer so niedrig, daß die entsprechende

Phenol	ΔpK_a	ΔH_{pt}° [kJ/Mol]	ΔS_{pt}° [J/Mol·K]	ΔG_{pt}° (22 °C) [kJ/Mol]
PCP	1.25	-12.2	-54.2	3.8
2,4,6-TCP	0.00	-11.4	-64.7	7.7
2,3,5-TCP	-0.44	-10.8	-71.6	10.3
p-Kresol	-4.19	-8.0	-107.6	23.7

Tab. 4.5.2: Thermodynamische Parameter des Protontransfers in den Systemen Phenol + Retinal-Schiffbase. Werte für p-Kresol aus Extrapolation der experimentellen Daten der anderen Systeme.

Gleichgewichtskonstante nicht unmittelbar bestimmt werden kann. Nach der Gleichung von Huyskens (s. Kap. 3.1) ist jedoch für Raumtemperatur (22 °C) eine Extrapolation von $\lg K_{pt}$ auf beliebige ΔpK_a -Werte möglich. Durch lineare Regression (Diagramm s. Abb. 4.5.8 c) wurden für die Parameter der Huyskens-Gleichung folgende Werte erhalten:

$$\xi = 0.653, \quad \delta = 1.462.$$

Damit ergibt sich für das System p-Kresol + Retinal-Schiffbase

$$\lg K_{pt} = -4.20 \text{ bzw. } \Delta G_{pt}^\circ = 23.7 \text{ kJ/Mol.}$$

ΔG_{pt}° ist proportional zu $\lg K_{pt}$ und damit nach der Huyskens-Gleichung proportional zu ΔpK_a . Abb. 4.5.8a und b zeigen, daß diese lineare Beziehung in guter Näherung auch für ΔH_{pt}° und ΔS_{pt}° gilt. Die in Tab. 4.5.2 für das p-Kresol-System angegebenen Daten konnten so durch lineare Regression und Extrapolation erhalten werden. Die Summe von auf diese Weise erhaltenen Enthalpie- und Entropietermen ergab auf eine Nachkommastelle genau den Wert für ΔG_{pt}° , der sich nach der Huyskens-Gleichung ergeben hatte.

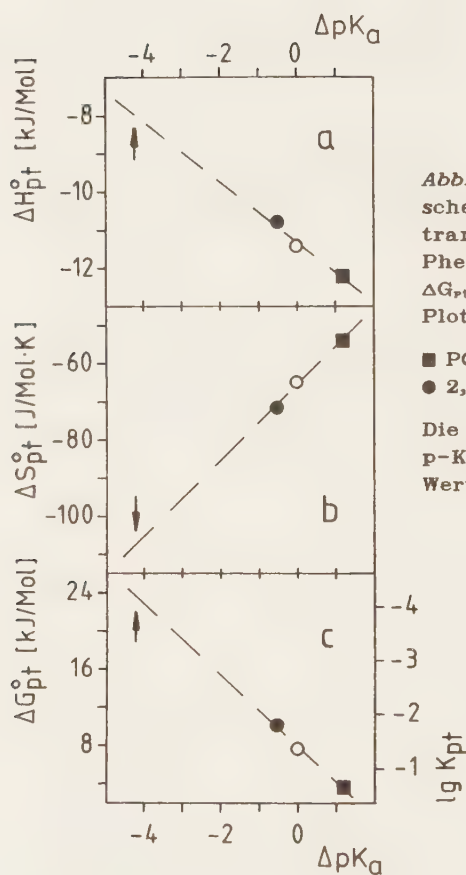


Abb. 4.5.8: Thermodynamische Parameter des Protontransfers in den Systemen Phenol + Retinal-Schiffbase. ΔG_{pt}° bzw. $\lg K_{pt}$ (Huyskens-Plot) für 22 °C.

■ PCP, ○ 2,4,6-TCP,
● 2,3,5-TCP;

Die Pfeile zeigen auf die für p-Kresol zu erwartenden Werte.

Kontinuum

Die Extinktionskoeffizienten der kontinuierlichen Absorption (s. Kap. 3.2 und 4.3) sind in Tab. 4.5.3 gezeigt. Hierbei ist speziell der Wert für das p-Kresol-System mit einem großen Fehler behaftet, da überhaupt nur für niedrige Temperaturen ein Kontinuum zu beobachten war. Bei höheren Temperaturen war die Komplexkonzentration zu niedrig; die beobachtete Intensität des Kontinuums lag unterhalb der Meßgenauigkeit. Der Wert für das Pentachlorphenol-System ist nicht temperaturabhängig; demgegenüber deutet sich in den beiden mittleren Systemen eine geringe Zunahme der kontinuierlichen Absorption mit abnehmender Temperatur an. Eine genauere Analyse würde jedoch weitere Messungen bei höheren Konzentrationen erfordern.

Phenol	PCP	2,4,6-TCP	2,3,5-TCP	p-Kresol
ΔpK_a	1.25	0.00	-0.44	-4.19
ε_c [l/Mol·cm]	80	35	32	~3

Tab. 4.5.3: Extinktionskoeffizienten der kontinuierlichen Absorption, gemessen bei 1960 cm^{-1} . PCP und 2,4,6-TCP: Mittelwerte über verschiedene Temperaturen; 2,3,5-TCP bei $20\text{ }^\circ\text{C}$ (bei $-3\text{ }^\circ\text{C}$ $\varepsilon_c = 41\text{ l/Mol}\cdot\text{cm}$); p-Kresol bei $0\text{ }^\circ\text{C}$.

4.6 Carbonsäure + Retinal-Schiffbase

Es wurden die Gleichgewichte der Brückenbildung und des Protontransfers im System Essigsäure + Butylamin-Retinal-Schiffbase, das als Modell für eine Asparaginsäure- oder Glutaminsäure-Schiffbase-Wasserstoffbrücke in Proteinen gelten kann, in Abhängigkeit von der Temperatur bestimmt. Um Informationen über Brücken zwischen Carbonsäuren und einer Retinal-Schiffbase allgemein zu erhalten, wurden auch die Protontransfergleichgewichte in Systemen mit substituierten Essigsäuren ermittelt, jedoch nur bei Raumtemperatur.

In Systemen, die Carbonsäuren enthalten, liegen i. a. kompliziertere Verhältnisse vor als in anderen Systemen, da hier

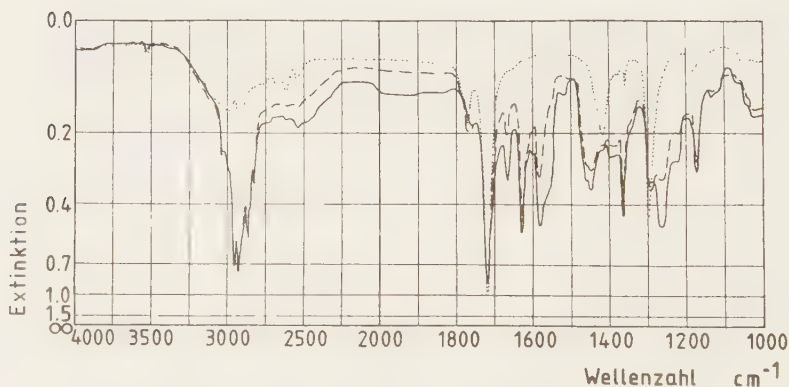


Abb. 4.6.1: IR-Spektren des Systems Essigsäure (AcOH) + Butylamin-Retinal-Schiffbase (BuNRet) in CCl_4 .

..... AcOH, 40 mM, 30 °C;
 AcOH + BuNRet, 30 mM:
 --- 32.0 °C, — -10.7 °C.

zusätzlich zu den in Kap. 4.4 besprochenen Gleichgewichten der *Brückenbildung* und des *Protontransfers* (die Dissoziation der polaren Grenzstruktur muß in den meisten Fällen nicht berücksichtigt werden) noch das *Dimerisationsgleichgewicht* der Carbonsäure in die Auswertung miteinbezogen werden muß:



mit M: monomere und

D: dimere Carbonsäure.

Brückenbildung

Das Brückenbildungsgleichgewicht ist folgendermaßen zu formulieren:

$$K_b = [N]/([M] \cdot [B]).$$

Geht man von 1:1-Mischungen von Säure und Base aus, so gilt für die Einwaagekonzentration [I]:

$$[I] = [M] + 2 \cdot [D] + [N] + [P] \quad \text{für die Carbonsäure bzw.}$$

$$[I] = [B] + [N] + [P] \quad \text{für die Retinal-Schiffbase.}$$

Für die Konzentration [B] der freien Base gilt demnach:

$$[B] = [M] + 2 \cdot [D].$$

Da für die Beziehung zwischen [M] und [D] die oben angegebene Gleichung für das Dimerisationsgleichgewicht besteht, kann zwischen diesen Größen leicht umgerechnet werden, so daß für die Ermittlung der Gleichgewichtskonstanten der Brückenbildung nur die Konzentration der unpolaren Spezies der Wasserstoffbrücke sowie wahlweise die Konzentration der monomeren oder dimeren Carbonsäure aus dem IR-Spektrum bestimmt werden müssen. Alle drei Spezies äußern sich im Spektrum durch die $\nu(\text{C=O})$ -Schwingung im Bereich $1800\text{--}1700 \text{ cm}^{-1}$, die einen großen Extinktionskoeffizienten aufweist und sich somit gut für eine quantitative Bestimmung eignet.

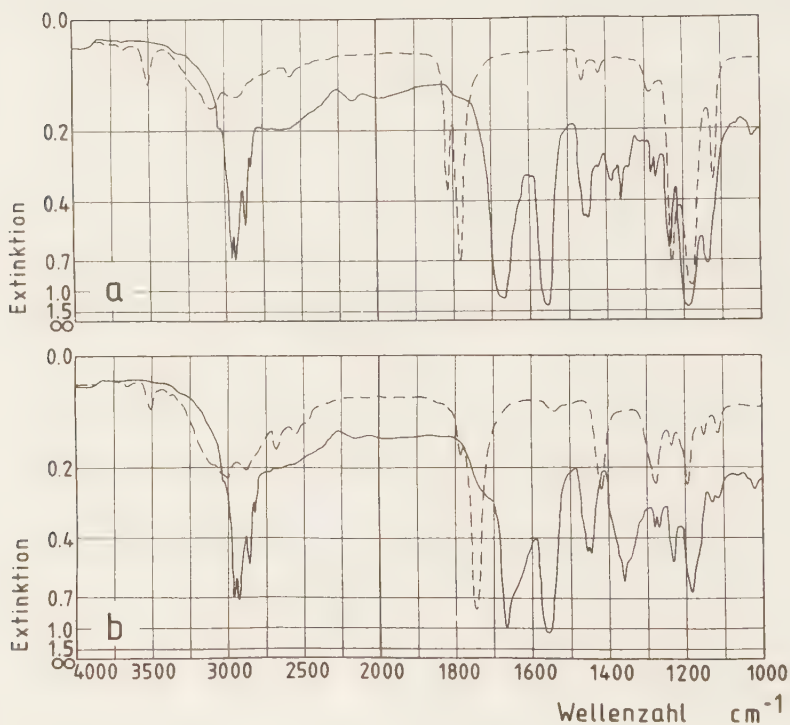
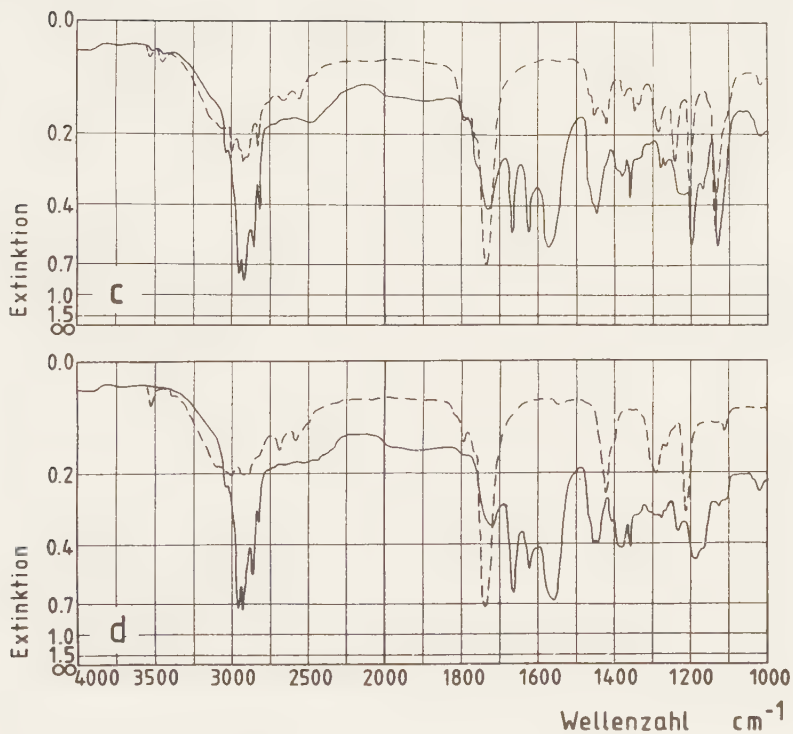


Abb. 4.6.2: IR-Spektren der Systeme Carbonsäure + Butylamin-Retinal-Schiffbase (BuNRet) in CCl_4 bei Raumtemperatur.

- a) --- Trifluoressigsäure (TFA), 30 mM;
 — TFA + BuNRet, 30 mM.
- b) --- Dichloressigsäure (DCA), 30 mM;
 — DCA + BuNRet, 30 mM.



- c) --- Methoxyessigsäure (MOA), 30 mM;
—— MOA + BuNRet, 30 mM.
- d) --- Monochloressigsäure (MCA), 30 mM;
—— MCA + BuNRet, 30 mM.

Für die *Essigsäure* wurden von U. Tangermann bereits alle für eine solche Auswertung nötigen Größen (Extinktionskoeffizienten der Banden der monomeren und der dimeren Säure sowie die thermodynamischen Parameter des Dimerisationsgleichgewichts) ermittelt [238]. Die Gleichgewichtskonstante der Dimerisation muß dabei für jede Temperatur aus Enthalpie und Entropie berechnet werden:

$$\ln K_d = -\Delta H_d^\circ + T \cdot \Delta S_d^\circ, \quad \text{wobei}$$

$$\Delta H_d^\circ = -41 \text{ kJ/Mol}, \quad \Delta S_d^\circ = -77 \text{ J/Mol} \cdot \text{K} \text{ [238]}.$$

Der Extinktionskoeffizient $\varepsilon(\nu(\text{C}=\text{O}, \text{N}))$, der für die Bestimmung der Konzentration der unpolaren Grenzstruktur nötig ist, kann in guter Näherung gleich dem halben Extinktionskoeffizienten der entsprechenden Bande des Dimeren gesetzt werden, d. h. die Extinktion je C=O-Gruppe wird als gleich groß angesehen.

Bei der praktischen Bestimmung der benötigten Konzentrationen ergeben sich jedoch gewisse Schwierigkeiten:

Zwar kann die Bande der monomeren Säure (1760 cm^{-1} bei der Essigsäure) gut von den Banden des Dimeren und des unpolaren Komplexes (ca. 1710 cm^{-1}) abgetrennt werden, jedoch ist daraus die Konzentration der dimeren Säure nur relativ ungenau zu erhalten. Dies beruht darauf, daß die Gleichgewichtskonstante der Dimerisation extrem groß ist - für -10°C ergibt sich ein Wert von $13\,062 \text{ dm}^3/\text{Mol}$ - und somit die Monomerenkonzentration sehr klein. Für das Dimere gilt nun:

$$[D] = K_d \cdot [M]^2,$$

d. h. es muß das Quadrat einer sehr kleinen Zahl gebildet und mit einer sehr großen Zahl multipliziert werden. Im System Essigsäure + Retinal-Schiffbase zeigte sich, daß hier die Bestimmung von $[M]$ viel zu ungenau ist, um eine sinnvolle Aussage über $[D]$ zu erlauben. Somit muß primär die Konzentration des Dimeren ermittelt werden.

Diese Bestimmung ist nun ihrerseits durch die Überlagerung der $\nu(\text{C}=\text{O}, \text{D})$ - mit der $\nu(\text{C}=\text{O}, \text{N})$ -Bande erschwert. Es zeigte sich jedoch, daß sich diese beiden Banden trotz ihrer eng benachbarten Lage (D bei 1714 cm^{-1} , N bei 1710 cm^{-1}) durch das er-

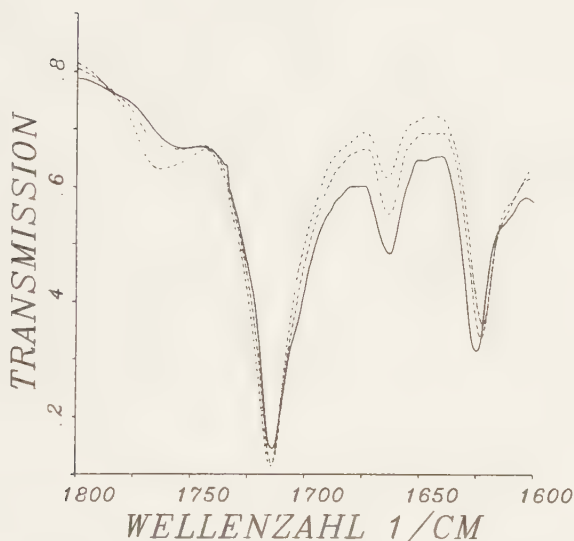
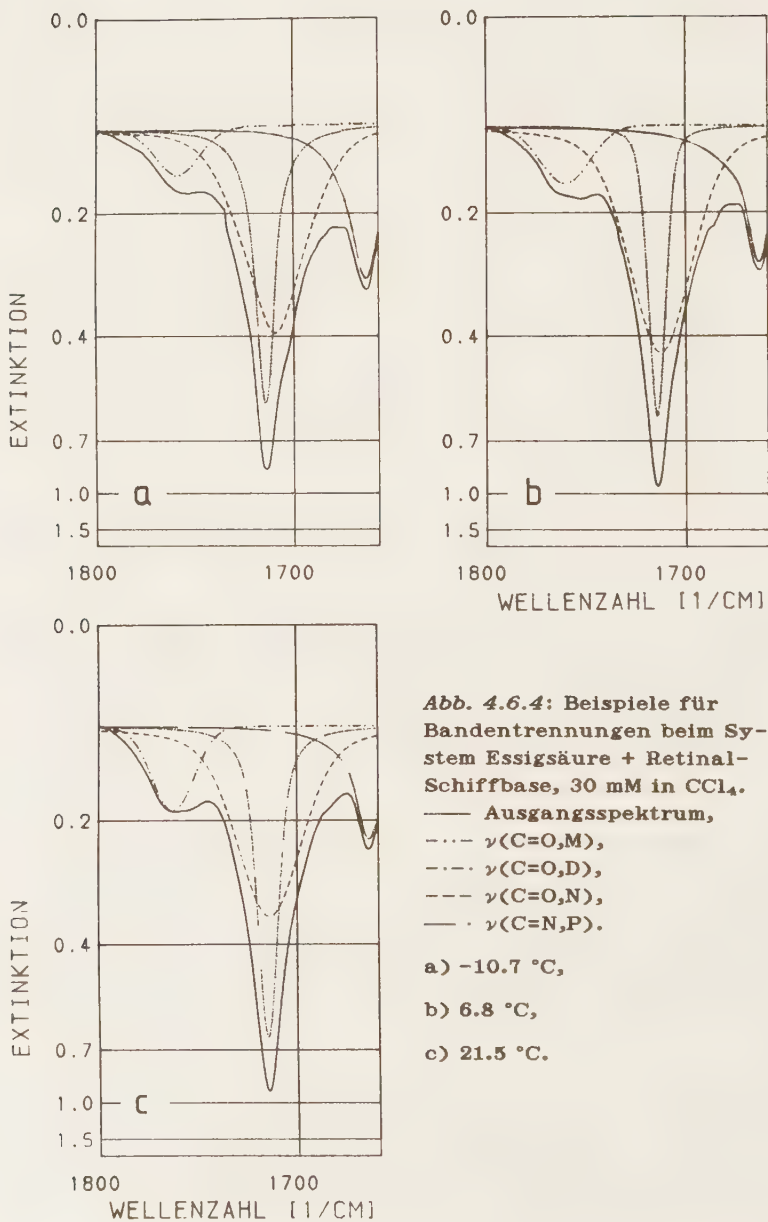


Abb. 4.6.3: $\nu(\text{C}=\text{O})$ -/ $\nu(\text{C}=\text{N})$ -Region des Systems Essigsäure + Retinal-Schiffbase, 30 mM in CCl_4 .

.... 32.0 °C, --- 14.1 °C, — -10.7 °C.

wähnte Bandentrennprogramm i. a. gut separieren lassen (s. Abb. 4.6.4). Dazu waren im interessierenden Spektralbereich insgesamt vier Banden zu trennen, außer den besprochenen von M, D und N noch die $\nu(\text{C}=\text{N},\text{P})$ der protonierten Schiffbase (s. u.) bei 1664 cm^{-1} . Der Grund für diese relativ gute Separierbarkeit dürfte nicht zuletzt in den deutlich verschiedenen Halbwertsbreiten der beiden sich überlagernden Banden zu sehen sein: Die Bande der unpolaren Grenzstruktur ist deutlich breiter als die des Dimeren.

Auf diese Weise waren die Konzentrationen [D] und [N] unmittelbar aus den integralen Intensitäten der entsprechenden Banden zu erhalten. Hieraus waren dann die für die Bestimmung der Brückenbildungsgleichgewichte benötigten Größen [M] und [B] wie bereits erläutert zu berechnen. Die Auftragung der so er-



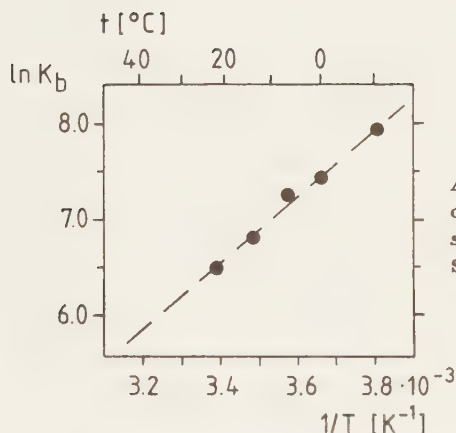


Abb. 4.6.5: van't-Hoff-Plot der Brückenbildung im System Essigsäure + Retinal-Schiffbase.

haltenen Gleichgewichtskonstanten nach van't-Hoff (Abb. 4.6.5) ergab folgende Ergebnisse:

$$\Delta H_b^{\circ} = -28.6 \text{ kJ/Mol},$$

$$\Delta S_b^{\circ} = -42.7 \text{ J/Mol}\cdot\text{K},$$

$$\Delta G_b^{\circ} = -16.0 \text{ kJ/Mol bei } 22^{\circ}\text{C}.$$

Bei den substituierten Carbonsäuren war eine explizite und genaue Bestimmung der Brückenbildungsgleichgewichte nicht möglich. Bei den stärkeren Säuren Dichloressigsäure (DCA) und Trifluoressigsäure (TFA) war der Protontransfer so groß, daß keine Bande der monomeren Säure mehr zu erkennen war und auch eine Trennung zwischen den Banden des Dimeren und der unpolaren Grenzstruktur aufgrund der geringen Intensität dieser Banden nicht möglich war (Abb. 4.6.6a und b). Bei der Monochloressigsäure (MCA) konnten diese beiden Banden zwar getrennt werden, jedoch war die Genauigkeit nicht zufriedenstellend. Eine Abtrennung der Bande des Monomeren erwies sich als mit dem Trennprogramm nicht möglich. Demzufolge sind in diesen drei Systemen auch die Werte für die Protontransfergleichgewichte (s. u.) mit einem deutlichen Fehler behaftet.

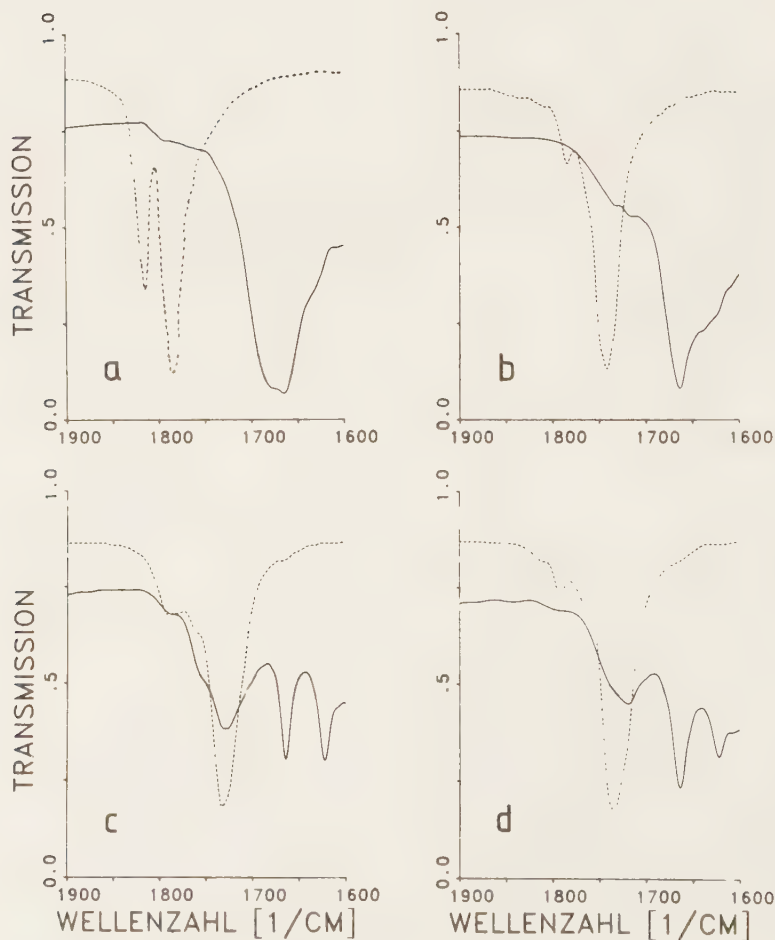


Abb. 4.6.6: $\nu(\text{C}=\text{O})$ – $\nu(\text{C}=\text{N})$ -Region der Systeme Carbonsäure + Butylamin-Retinal-Schiffbase (BuNRet), 30 mM in CCl_4 bei Raumtemperatur.

--- Reine Carbonsäure, — Komplex mit BuNRet.

a) TFA, b) DCA, c) MOA, d) MCA.

Des weiteren sollte noch das System Methoxyessigsäure (MOA) + Schiffbase untersucht werden. Dabei zeigte sich, daß hier außer den besprochenen Gleichgewichten noch mindestens ein weiteres berücksichtigt werden müßte, das sich in einer Bande bei 1760 cm^{-1} , also zwischen Monomeren- und Dimerenbande äußert, also wahrscheinlich ein weiteres, schwächer assoziiertes Dimeres, das aus einer Wasserstoffbrücke zwischen dem Äther-Sauerstoff und der OH-Gruppe der Säure resultieren dürfte (Abb. 4.6.6c). Eine Abtrennung dieser zusätzlichen Bande sowie die Bestimmung der damit zusammenhängenden Parameter erscheint illusorisch; MOA kann infolgedessen nur unter sehr günstigen Umständen - etwa bei einem sehr großen Protontransfer, der die zusätzliche Spezies nicht mehr auftreten läßt - für derartige Untersuchungen verwendet werden. Eine ähnliche Bande in schwächerer Ausprägung ist auch bereits bei der Dichloressigsäure zu bemerken und möglicherweise für die schlechte Bandentrennung in diesem System verantwortlich.

Protontransfer

Für die Bestimmung des Protontransfers gibt es in diesen Systemen zwei Möglichkeiten. Zum einen kann die Konzentration der polaren Spezies aus der integralen Extinktion der $\nu(\text{C}=\text{N},\text{P})$ der Schiffbase bei 1664 cm^{-1} berechnet werden, zum anderen kann man die Einwaagekonzentration zu dieser Bestimmung heranziehen:

$$[\text{P}] = [\text{I}] - [\text{M}] - 2 \cdot [\text{D}] - [\text{N}],$$

wobei die anderen in dieser Gleichung vorkommenden Größen wie oben erläutert ermittelt oder, falls - wie bei DCA und TFA - eine Bandentrennung nicht möglich sein sollte, aus der integralen Gesamtintensität der drei entsprechenden Banden summarisch bestimmt werden.

Im System Essigsäure + Retinal-Schiffbase erwies sich das erstere Verfahren als das genauere. Da hier infolge des relativ geringen Protontransfers die Summe über die Konzentrationen der protonierten Säure-Spezies ziemlich groß ist, ist natürlich auch der absolute Fehler dieser Bestimmung entsprechend groß und überträgt sich voll auf die Genauigkeit der zu bildenden Differenz. Man erhält nach dem zweiten Verfahren für [P] einen

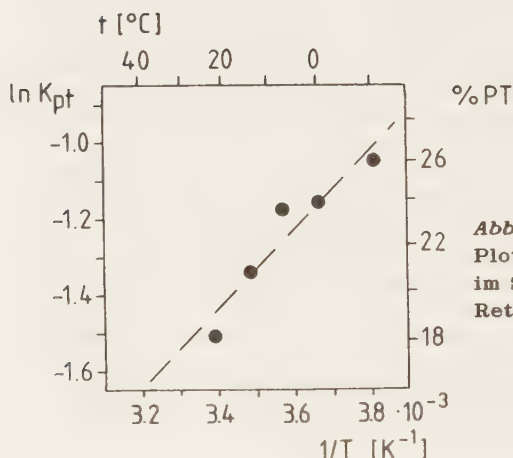


Abb. 4.6.7: van't-Hoff-Plot des Protontransfers im System Essigsäure + Retinal-Schiffbase.

Wert, der sicher zu klein ist, was ev. auf schwache zusätzliche Absorptionen unter den C=O-Banden zurückzuführen ist, die beispielsweise von der $\delta(\text{NH}, \text{P})$ der protonierten Schiffbase herühren können. Solche schwachen zusätzlichen Absorptionen, die von einer Bandentrennung nicht erfaßt werden können, verursachen bei der starken C=O-Absorption nur einen sehr geringen Fehler, so daß die Zuverlässigkeit der Bestimmung von [D] und [N] hiervon nicht wesentlich beeinflußt wird, wirken sich aber bei einer Differenzbildung entsprechend stark aus.

Bei der Bandentrennung zur Bestimmung der Brückenbildungskonstanten wurde die Bande der protonierten Schiffbase bereits abgetrennt (s. Abb. 4.6.4). Sie kann unmittelbar für die Bestimmung von [P] herangezogen werden. Die für die Berechnung der Protontransferkonstanten notwendige Konzentration [N] der unpolaren Grenzstruktur wurde ebenfalls bereits bestimmt. Eine Auftragung nach van't Hoff (Abb. 4.6.7) liefert die thermodynamischen Parameter:

$$\Delta H_{pt}^\circ = -8.7 \text{ kJ/Mol},$$

$$\Delta S_{pt}^\circ = -42.7 \text{ J/Mol} \cdot \text{K},$$

$$\Delta G_{pt}^\circ = +3.9 \text{ kJ/Mol bei } 22^\circ\text{C}.$$

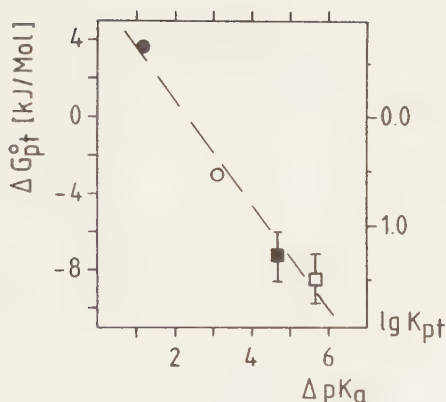


Abb. 4.6.8: Abhängigkeit von ΔG_{pt}° bzw. $\lg K_{pt}$ von ΔpK_a (Huyskens-Plot) in den Systemen Carbonsäure + Retinal-Schiffbase.

□ TFA, ■ DCA,
○ MCA, ● AcOH.

Beim MCA-System sind beide Methoden zur Bestimmung von $[P]$ anwendbar, erweisen sich jedoch beide als relativ ungenau. Der kritischere Fehler bei der Bestimmung von K_{pt} liegt jedoch in der Ungenauigkeit des für $[N]$ zu erhaltenden Wertes, da die Bandentrennung in diesem System (die ja auch hier die Auflösung von vier Banden bewerkstelligen muß) sich nur mäßig zuverlässig zeigt und beispielsweise auch keine eindeutige Zuordnung der Banden von D und N erlaubt.

Ähnliches gilt auch für die beiden anderen Systeme mit DCA und TFA als Protondonoren. Hier ist zwar $[P]$ infolge der geringen Konzentration der C=O-Gruppen enthaltenden Spezies nach dem zweiten Verfahren sehr genau zu erhalten, jedoch ist über $[N]$ so gut wie nichts bekannt. Es wurde hierbei angenommen, daß die $\nu(C=O)$ -Bande im Extremfall entweder *nur* von der unpolaren Grenzstruktur verursacht wird ($[D] = 0$) oder zu maximal zwei Dritteln vom Dimeren herrührt (da der Extinktionskoeffizient von D infolge der zwei C=O-Gruppen je Molekül doppelt so groß ist wie der von N, wäre hierbei $[D] = [N]$, ein Verhältnis, das in keinem der anderen untersuchten Systeme je

Säure	ΔpK_a	ΔG_{pt}° [kJ/Mol]	% PT
TFA	5.77	-8.5 (± 1.3)	97
DCA	4.69	-7.3 (± 1.3)	95
MCA	3.13	-3.1	78
AcOH	1.23	3.6	19

Tab. 4.6.1: Protontransferegleichgewichte in den untersuchten Systemen Carbonsäure + Retinal-Schiffbase bei 22 °C.

erreicht wird). Damit ergeben sich die in Tab. 4.6.1 angegebenen Fehlerbereiche. Die Extinktionskoeffizienten der $\nu(C=O)$ -Bande wurden ohne Differenzierung bzgl. M und D, aus den integralen Gesamtextinktionen der beiden Banden der reinen Säuren erhalten.

In Abb. 4.6.8 ist die Auftragung von $\lg K_{pt}$ gegen ΔpK_a gezeigt. Die gute Linearität demonstriert die Gültigkeit der Huyskens-Gleichung; für die Parameter dieser Gleichung erhält man:

$$\xi = 0.483, \quad \delta = 1.111.$$

Kontinuum

Die Extinktion der kontinuierlichen Absorption wurden bei 2000 cm^{-1} bestimmt, durch Division durch die Komplexkonzentra-

Säure	TFA	DCA	MCA	AcOH
ΔpK_a	5.77	4.69	3.13	1.23
ϵ_c [l/Mol·cm]	49	47	80	30

Tab. 4.6.2: Extinktionskoeffizienten der kontinuierlichen Absorption (gemessen bei 2000 cm^{-1}) bei 22 °C.

tion $[C] = [N] + [P]$ und die Schichtdicke ($528 \mu\text{m}$) ergeben sich die in Tab. 4.6.2 angegebenen Extinktionskoeffizienten. Beim Essigsäuresystem wurde die Extinktion des Kontinuums auch in Abhängigkeit von der Temperatur bestimmt, es zeigte sich dabei, daß das Kontinuum mit abnehmender Temperatur deutlich zunimmt ($\varepsilon = 43.5 \text{ l/Mol}\cdot\text{cm}$ bei -10.7°C).

4.7 Phenol + Carboxylat

Untersucht wurden Brücken vom Typ $AH \cdots B^- \rightleftharpoons A^- \cdots HB$, wobei für AH verschieden substituierte Phenole und für B^- Acetat (als Tetrabutylammoniumsalz) eingesetzt wurden.

Diese Systeme sind insofern ungewöhnlich, als es sich dabei um geladene Wasserstoffbrücken handelt. Bei diesen ist es nicht sinnvoll, zwischen polarer und unpolarer Grenzstruktur zu unterscheiden, beide Strukturen sind geladen, wobei sich mit Verschiebung des Protons der Ladungsschwerpunkt verschiebt (s. Tab. 4.7.1 und 4.7.2). Das Dipolmoment der Brücke kehrt beim Protontransfer sein Vorzeichen um, dem Betrag nach wird es sich jedoch - im Gegensatz zu ungeladenen Brücken - nur wenig ändern. Danach wäre auch nur eine geringe Protontransfer-Entropie zu erwarten, da diese hauptsächlich durch die Änderung des Ordnungsgrades der Umgebung bedingt wird, der umso größer ist, je größer der Betrag des Dipolmoments der Wasserstoffbrücke ist (s. Kap. 3.1).

Kleine Protontransfer-Entropien führen jedoch dazu, daß sowohl Entropie als auch Enthalpie des Protontransfers nicht mehr genau bestimmt werden können, da die Änderungen des Protontransfers mit der Temperatur zu gering werden (s. Kap. 4.4). Dies zeigte sich auch bei der Bestimmung der thermodynamischen Parameter der Phenol-Carboxylat-Brücken. Es war nicht möglich, für ΔH_{pt}° und ΔS_{pt}° exakte Werte zu erhalten, sondern nur - unter Berücksichtigung der Meßungenauigkeit - entsprechende Intervalle.

Die Bestimmung dieser Größen war auch dadurch erschwert, daß in diesen Systemen eine Reihe von Gleichgewichten zu berücksichtigen sind (Tab. 4.7.2). Bei der Bestimmung der thermodynamischen Parameter wurde im Einzelnen wie folgt vorgegangen:

Formel	Abkürzung	Erläuterung
Ar-OH	AH	freies Phenol (= Säure)
CH ₃ COO ⁻	B ⁻	Acetat (= Base)
AH...B ⁻	L	linke Grenzstruktur
A ⁻ ...HB	R	rechte Grenzstruktur
CH ₃ COOH	HB = M	freie monomere Essigsäure
(HB) ₂	D	Essigsäure-Dimer
Ar-O ⁻	A ⁻	freies Phenolat

Tab. 4.7.1: Mögliche Spezies im System Phenol + Acetat.

Gleichgewicht	Gleichgewichtskonst.	Bezeichnung
$AH + B^- \rightleftharpoons AH \cdots B^-$	$K_b = [L] / ([AH] \cdot [B^-])$	Brückenbildung
$AH \cdots B^- \rightleftharpoons A^- \cdots HB$	$K_{pt} = [R] / [L]$	Protontransfer
$A^- \cdots HB \rightleftharpoons A^- + HB$	$K_{dis} = [A^-] \cdot [M] / [R]$	Dissoziation
$2 HB \rightleftharpoons (HB)_2$	$K_d = [D] / [M]^2$	Dimerisierung

Tab. 4.7.2: Gleichgewichte im System Phenol + Acetat.

Brückenbildung

Die Komplexkonzentration [C] ist definiert als die Summe der Konzentrationen der linken und der rechten Grenzstruktur:

$$[C] = [L] + [R].$$

Zu ihrer Ermittlung müssen die Einwaagekonzentrationen des Phenols bzw. des Acetats herangezogen werden. Da von 1:1-Mischungen ausgegangen wurde, sind beide gleich; sie seien mit [I] bezeichnet:

$$[I] = [A^-] + [AH] + [C] \quad \text{für das Phenol bzw.}$$

$$[I] = [M] + 2 \cdot [D] + [B^-] + [C] \quad \text{für das Acetat.}$$

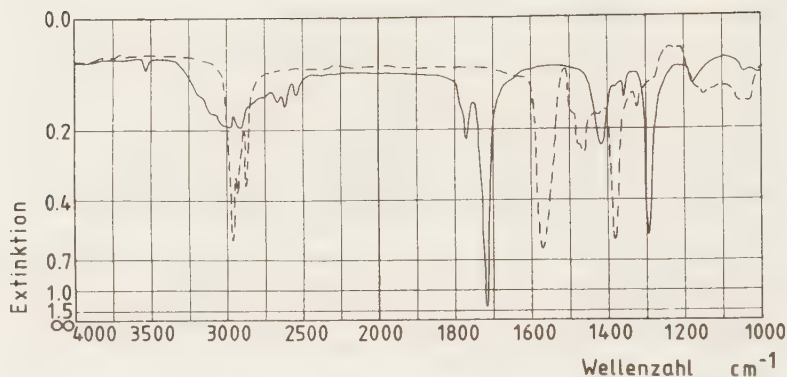


Abb. 4.7.1: IR-Spektren von

--- Tetrabutylammoniumacetat (TBAA), 19 mM in CCl_4 ,
 — Essigsäure, 40 mM in CCl_4 .

Da $[\text{B}^-] = [\text{AH}]$ und $[\text{A}^-] = [\text{M}] + 2 \cdot [\text{D}]$ ([238]), erhält man für die Komplexkonzentration:

$$[\text{C}] = [\text{I}] - [\text{M}] - 2 \cdot [\text{D}] - [\text{AH}] \quad \text{bzw.} \\
[\text{C}] = [\text{I}] - [\text{M}] - 2 \cdot K_d \cdot [\text{M}]^2 - [\text{AH}];$$

diese Gleichung enthält nur noch bekannte ($[\text{I}]$) bzw. bestimmbare ($[\text{M}]$, $[\text{AH}]$) Größen.

Die Konzentration der monomeren Spezies $[\text{M}]$ läßt sich aus dem IR-Spektrum ($\nu(\text{C}=\text{O}, \text{M})$, 1765 cm^{-1}) nach Bandentrennung erhalten:

$$[\text{M}] = E(\nu(\text{C}=\text{O}, \text{M})) / d \cdot \varepsilon(\nu(\text{C}=\text{O}, \text{M})).$$

Extinktionskoeffizient von Monomeren- und Dimerenbande sowie Dimerisationsgleichgewicht (K_d) wurden von U. Tangermann durch die Untersuchung einer Lösung reiner Essigsäure bei ver-

schiedenen Temperaturen bestimmt [238] (s. Kap. 4.6). Die Konzentration der dimeren Essigsäure ergibt sich dann aus:

$$[D] = K_d \cdot [M]^2.$$

Die Konzentration des freien Phenols $[AH]$ läßt sich aus der Extinktion der OH-Valenzschwingung $E(\nu(OH,AH))$ bei 3550 cm^{-1} ermitteln. Der Extinktionskoeffizient dieser Bande wurde jeweils an einer Lösung des reinen substituierten Phenols bestimmt.

Protontransfer

Das Protontransfergleichgewicht läßt sich aus den Banden der Carboxylgruppe der linken ($\nu_{as}(CO_2^-,L)$, 1650 cm^{-1}) bzw. der rechten Grenzstruktur ($\nu(C=O,R)$, 1700 cm^{-1}) bestimmen. Die integralen Extinktionen dieser Banden wurden durch eine Bandentrennung ermittelt. Für den Extinktionskoeffizienten der linken Grenzstruktur wurde dabei der an einer Lösung von reinem Tetrabutylammoniumacetat erhaltene Wert $\epsilon(\nu_{as}(CO_2^-,B^-))$ verwendet, für den der rechten Grenzstruktur der halbe der dimeren Essigsäure [238], unter der Annahme, daß die C=O-Gruppen im Dimer und im Komplex gleich große Absorption zeigen. Die Gleichgewichtskonstante des Protontransfers ergibt sich dann zu:

$$K_{pt} = [R]/[L].$$

Die so von U. Tangermann [238] erhaltenen Ergebnisse sind in Tab. 4.7.3 zusammengefaßt. Die Vorzeichen der Werte für ΔpK_a sind hier entgegengesetzt zu denen in [237] und [238], da in vorliegender Arbeit Acetat als die Base im System betrachtet wird und damit ΔpK_a die Differenz zwischen den pK_a -Werten der Essigsäure (als der protonierten Base) und des Phenols ist (s. Kap. 3.1). Dies erscheint aus zwei Gründen sinnvoll: Zum einen werden die Komponenten der Systeme in eben dieser Form zusammengegeben (Phenol protoniert, also als Donor, Acetat als Akzeptor), zu anderen ist dies auch die Form, in der die entsprechenden Gruppierungen Tyrosin und Aspartat in Bakteriorhodopsin vorliegen.

Phenol	ΔpK_a	ΔH_{rt}° [kJ/Mol]	ΔS_{rt}° [J/Mol·K]	ΔG_{rt}° (22 °C) [kJ/Mol]
PCP	0.02	-7 (± 2)	22 (± 7)	-0.6
2,4,6-TCP	-1.23	-4 (± 1)	20 (± 4)	1.8
2,3,5-TCP	-1.67	-2 (± 1)	16 (± 4)	2.6
p-Kresol	-5.42	8 (± 2)	5 (± 7)	9.5

Tab. 4.7.3: Thermodynamische Parameter des Protontransfers in den Systemen Phenol + Tetrabutylammoniumacetat (nach [238]). Werte für p-Kresol aus Extrapolation der experimentellen Daten der anderen Systeme.

p-Kresol + Acetat als Modell für eine Tyr-Asp-Wasserstoffbrücke

Abb. 4.7.2 zeigt das IR-Spektrum des p-Kresol+Acetat-Systems (über dem Spektrum des reinen p-Kresols) bei Raumtemperatur (22 °C).

Die Brückenbildung ist im Rahmen der Meßgenauigkeit nahezu

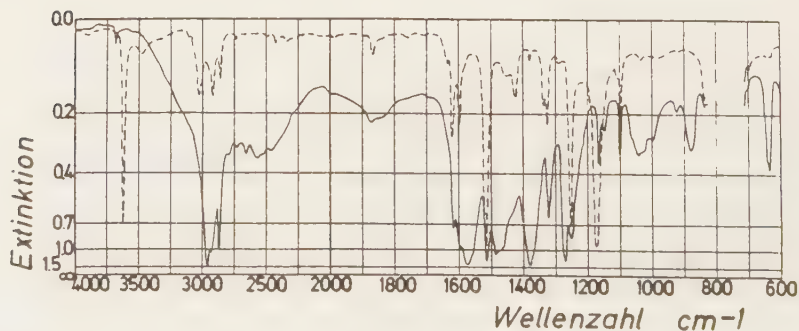


Abb. 4.7.2: IR-Spektren von

--- p-Kresol, 60 mM in CCl_4 ,

— p-Kresol + TBAA, 60 mM in CCl_4 .

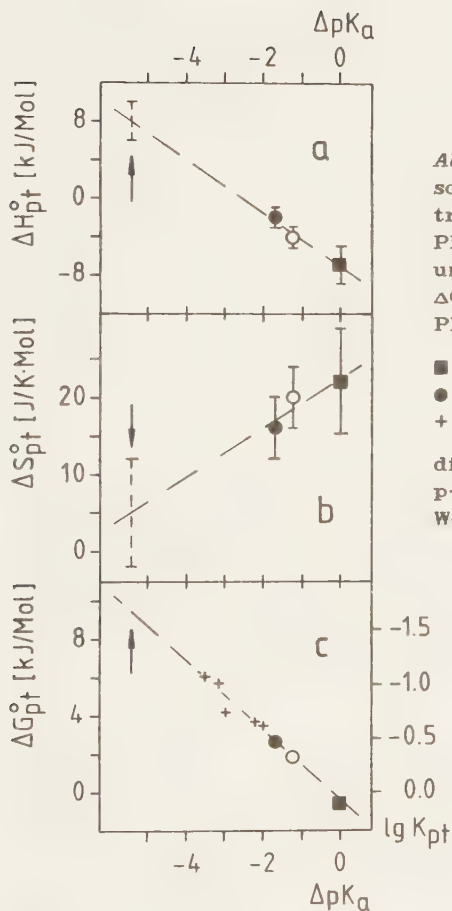


Abb. 4.7.3: Thermodynamische Parameter des Protontransfers in den Systemen Phenol + Tetrabutylammoniumacetat (nach [238]). ΔG_{pt}° bzw. $\lg K_{pt}$ (Huyskens-Plot) für 22 °C.

■ PCP, ○ 2,4,6-TCP,
● 2,3,5-TCP;
+ weitere Systeme (s. [238]);

die Pfeile zeigen auf die für p-Kresol zu erwartenden Werte.

vollständig, wie aus dem Fehlen der $\nu(\text{OH}, \text{AH})$ bei 3550 cm^{-1} ersichtlich ist; explizite Werte sind an diesem System nicht zu erhalten, da die sehr geringe Restkonzentration an freiem Phenol nicht bestimmt werden kann.

Aus dem Fehlen einer C=O-Valenzschwingung $\nu(\text{C=O,R})$ bei 1700 cm^{-1} ergibt sich, daß der *Protontransfer* sehr gering ist, d. h. K_{pt} ist sehr klein, $\Delta G_{\text{pt}}^\circ$ positiv und relativ groß. Der genaue Wert für K_{pt} (und damit für $\Delta G_{\text{pt}}^\circ$) kann über die Huyskens-Gleichung extrapoliert werden. Die Parameter dieser Gleichung (s. Kap. 3.1) wurden von U. Tangermann durch Messungen an einer Reihe von Phenol-Acetat-Systemen bei Raumtemperatur sehr genau bestimmt [238] (s. Abb. 4.7.3c; die Linearität der Auftragung demonstriert die Gültigkeit der Huyskens-Gleichung). Es ergaben sich folgende Werte:

$$\xi = 0.324; \quad \delta = 0.079.$$

Damit erhält man für p-Kresol durch Extrapolation (die Vorzeichen sind - aus oben dargelegten Gründen - entgegengesetzt zu denen in [238]):

$$\lg K_{\text{pt}} = 1.68 \quad \text{bzw.} \quad \Delta G_{\text{pt}}^\circ = 9.5 \text{ kJ/Mol.}$$

Unter der Annahme, daß auch $\Delta H_{\text{pt}}^\circ$ und $\Delta S_{\text{pt}}^\circ$ linear von ΔpK_a abhängen, ist auch eine Aufschlüsselung nach Enthalpie und Entropie möglich. Abb. 4.7.3a und b zeigen die entsprechenden Graphen; die möglichen Abweichungen der Werte sind durch Fehlerbalken dargestellt. Durch lineare Extrapolation wurden die in Tab. 4.7.3, letzte Zeile, gezeigten Daten erhalten.

4.8 Fehlerdiskussion

Fehler bei der Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten können durch eine Reihe von Ungenauigkeiten zustandekommen, von denen im folgenden einige diskutiert werden. Ihre Auswirkung auf das eigentlich interessierende Ergebnis der Untersuchung, etwa Enthalpie und Entropie der Reaktionen oder die Parameter ξ und δ der Huyskens-Gleichung hängt dabei stark von den jeweiligen Systemen ab. So wirkt sich etwa eine Ungenauigkeit in der Bestimmung der Konzentration der polaren Spezies umso stärker aus, je niedriger der Protontransfer im jeweiligen System ist. Abb. 4.5.7 (rechte Skala) zeigt, daß sich die zu beobachtenden temperaturbedingten Änderungen beim 2,3,5-TCP-System im Bereich von ca. 1 % PT abspielen, während die entsprechenden Variationen beim PCP-System etwa 15 % PT umfassen. In Einheiten von $\ln K_{pt}$ sind jedoch die Änderungen in beiden Systemen praktisch gleich groß. Hieraus ist leicht ersichtlich, daß die Bestimmung der $\ln K_{pt}$ -Werte im 2,3,5-TCP-System deutlich weniger genau ist, als im PCP-System, was auch in einer etwas stärkeren Streuung der Punkte zum Ausdruck kommt.

Andererseits ist etwa in den Systemen TFA bzw. DCA + BuNRet die Konzentration $[N]$ der unpolaren Grenzstruktur nur sehr näherungsweise bestimmbar, die möglichen Werte können im Prinzip um den Faktor drei variieren; dennoch ist die durch diese Ungenauigkeit hervorgerufene Variation in ΔG_{pt}° (s. Fehlerbalken in Abb. 4.6.8) praktisch bedeutungslos und der Wert für den Protontransfer ist von diesem Fehler so gut wie gar nicht betroffen.

Einwaagefehler

Bei Systemen, bei denen die Einwaagekonzentration [I] in die Auswertung eingeht, ist ein Fehler beim Einwiegen der Substanz bzw. beim Herstellen der Lösungen zu berücksichtigen. Die verwendete Analysenwaage arbeitet mit einer Abweichung von ca. 0.1 mg, was bei Substanzmengen im Bereich von 20 bis 40 mg einen Fehler von max. 0.5 % bei der Einwaagekonzentration bedingt. Der Fehler, der beim Abmessen der Flüssigkeitsmengen durch die Ungenauigkeit der Pipetten und durch etwaige Verdunstungsverluste entsteht, liegt etwa bei 1 %.

Fehler bei der Aufnahme der IR-Spektren

Bei der Aufnahme der IR-Spektren können im Prinzip mehrere Fehler auftreten. Zum einen unmittelbare Meßfehler des IR-Spektrometers - diese können gegenüber den anderen Fehlermöglichkeiten mit Sicherheit vernachlässigt werden -, zum anderen tritt bei der Übertragung der Spektren auf das Mikrocomputersystem ein Digitalisierungsfehler auf. Bei 190 Digitalisierungsschritten im gesamten Transmissions-Meßbereich beträgt der Fehler etwas mehr als 0.5 % Transmission. Eine entsprechende Umrechnung auf die Konzentration der Spezies, deren IR-Absorption bestimmt wird, ist nicht eindeutig möglich. Der Fehler wird sowohl für sehr schwache als auch für sehr starke Absorptionen größer und ist für mittelstarke am geringsten. Der Fehler, der bei der Bestimmung der einfachen Extinktion einer Bande gemacht wird, die zu 50 % Absorption führt - dann ist $E = 0.301$ - beträgt 0.004 Extinktionseinheiten oder 1.4 % relativ. Bei 90 % Transmission ($E = 0.046$) beträgt der relative Fehler bereits über 5 %.

Eine weitere Abweichung kommt bei der Keilkorrektur ins Spiel; sie wirkt sich jedoch vor allem bei dünnen Keilen ($d < 100 \mu\text{m}$) und starken Extinktionen aus und muß bei den hier betrachteten Untersuchungen nicht berücksichtigt werden.

Fehler bei der Auswertung der Spektren

Die größten Fehler treten sicher bei der quantitativen Auswertung der Spektren auf. Mögliche Ursachen sind die Annahme einer falschen Basislinie und eine ungenaue Trennung sich überlagernder Banden. Gerade in den in dieser Arbeit betrachteten Systemen mit starken intermolekularen Wechselwirkungen ist die Basislinie oft nur ungenau zu ermitteln, da sie durch den Verlauf der kontinuierlichen Absorption mitbestimmt wird. Für die praktische Auswertung wird i. a. so vorgegangen, daß zwei Punkte des Spektrums, an denen keine Banden zu erkennen sind, durch eine Gerade verbunden werden; der exakte Verlauf ist nicht zu ermitteln.

Fehler bei der Bandentrennung sind nicht durch Ungenauigkeiten des numerischen Verfahrens bedingt, sondern dadurch, daß in vielen Fällen die zu trennenden Banden von weiteren, wenn auch schwachen, Banden überlagert werden und damit eine saubere Trennung nicht mehr möglich ist. Meßtechnische ebenso wie Fehler bei der Festlegung der Basislinie führen ebenfalls dazu, daß sich der zu untersuchende spektrale Bereich nicht mehr eindeutig als Summe von theoretischen Bandenformen darstellen läßt bzw. die Parameter der anzufittenden Banden falsch gewählt werden.

Diese Fehler wurden dadurch soweit wie möglich zurückgedrängt, daß alle Bandentrennungen mehrfach unter Ansatz verschiedener Anfangsparameter (dies führt i. a. bereits zu mehr oder weniger verschiedenen Ergebnissen, was zeigt, daß das Trennprogramm nicht immer in der Lage ist, eine absolut optimale Lösung zu finden) und unterschiedlicher Basislinien durchgeführt wurden; die Auswahl der für die weiteren Berechnungen zu verwendenden Ergebnisse erfolgte im wesentlichen durch Überprüfung der aus der Trennung erhaltenen Banden (s. Abb. 4.5.6 und 4.6.4); schlechte Trennungen sind i. a. leicht an ungewöhnlichen Bandenformen oder -lagen zu identifizieren. Eine Abschätzung des Fehlers kann durch Vergleich der mit verschiedenen Trennungen erhaltenen integralen Extinktionen erfolgen, die Abweichungen bewegen sich hier im Bereich von 5 bis 20 %.

In Anbetracht der bei der unmittelbaren Auswertung der Spektren auftretenden Ungenauigkeiten sind die Fehler, die durch vereinfachtes Ansetzen der Gleichgewichte - etwa durch die Vernachlässigung der Dissoziation der polaren Grenzstruktur - sicher nicht signifikant. Ähnliches gilt auch für die Möglichkeit, daß ΔH° und ΔS° in manchen Fällen temperaturabhängig sein können: Nur bei sehr starker Temperaturabhängigkeit wird sich diese in den Ergebnissen äußern; andererseits darf auch aus den hier erhaltenen van't-Hoff-Geraden nicht definitiv auf die Temperaturunabhängigkeit der entsprechenden Parameter geschlossen werden.

Infolge der Logarithmierung und der Mittelung durch lineare Regression wirken sich Fehler bei der Konzentrationsbestimmung für einzelne Spezies nur geringfügig auf die Genauigkeit der thermodynamischen Parameter aus. Selbst Ungenauigkeiten bei der Konzentrationsbestimmung von 10 oder 20 % führen bei ΔH° und ΔS° nur zu Variationen um wenige Prozent. Dies darf aber nicht darüberhinwegtäuschen, daß bei der Berechnung von Gleichgewichtskonstanten aus den thermodynamischen Parametern diese in vielen Fällen - insbesondere bei sehr kleinem und sehr großem Protontransfer - nur sehr angenähert erhalten werden.

4.9 Zusammenfassung und Diskussion der experimentellen Ergebnisse

In den drei Systemfamilien Phenol + Retinal-Schiffbase, Carbonsäure + Retinal-Schiffbase und Phenol + Acetat wurden die Gleichgewichtskonstanten der Brückenbildung K_b und des Protontransfers K_{pt} in Abhängigkeit vom ΔpK_a bestimmt. Aus der Temperaturabhängigkeit der Gleichgewichte wurden die entsprechenden thermodynamischen Parameter ΔH° und ΔS° erhalten. Die kontinuierliche IR-Absorption in den untersuchten Systemen zeigt die große Protonenpolarisierbarkeit der Wasserstoffbrücken.

Brückenbildung

Bei den Systemen *Phenol + Retinal-Schiffbase* (Kap. 4.5, Zusammenfassung s. Tab. 4.5.1) bewegt sich die Enthalpie der Brückenbildung im Bereich von ca. -30 bis -50 kJ/Mol, die Entropiewerte liegen zwischen -60 und -110 J/Mol·K. Es zeigte sich, daß bei diesen Systemen keine Reihung entsprechend dem ΔpK_a -Wert - wie für die Protontransferegleichgewichte (s. u.) - möglich ist. Qualitativ läßt sich aber sagen, daß azidere Phenole stärkere Brücken bilden als weniger azide (PCP bildet die stärksten Komplexe aus); als zusätzlicher Einfluß ist jedoch die sterische Behinderung durch Substituenten in ortho-Position zur OH-Gruppe von Bedeutung. Dies entspricht analogen Beobachtungen an Phenol-Amin-Brücken [207].

Im System *Essigsäure + Retinal-Schiffbase* (Kap. 4.6) liegen die thermodynamischen Parameter der Brückenbildung bei $\Delta H_b^\circ = -28.6$ kJ/Mol und $\Delta S_b^\circ = -42.7$ J/Mol·K. Damit ergibt sich für die freie Enthalpie der Brückenbildung bei Raumtemperatur (22 °C) ein Wert von $\Delta G_b^\circ = -16$ kJ/Mol. Die entsprechenden Daten der anderen Carbonsäure-Schiffbase-Systeme wurden nicht bestimmt.

Die geladenen Phenol-Acetat-Brücken (Kap. 4.7) sind deutlich stärker als ungeladene Brücken, wobei beide Grenzstrukturen vergleichbare - und immer große - Bildungskonstanten aufweisen. Die genauen Werte konnten nicht ermittelt werden, da die Konzentrationen der freien Spezies zu gering für eine Bestimmung waren. Qualitativ läßt sich sagen, daß die Werte der Enthalpie und der freien Enthalpie deutlich über den entsprechenden Werten bei den Phenol-Schiffbase- und Carbonsäure-Schiffbase-Systemen liegen.

Protontransfer

Bei den Systemen *Phenol + Retinal-Schiffbase* (Kap. 4.5, Zusammenfassung s. Tab. 4.5.2) fällt auf, daß ΔH_{pt}° mit -8 bis -12 kJ/Mol betragsmäßig recht klein ist und sich mit ΔpK_a nur sehr geringfügig ändert. In diesen Systemen werden Änderungen des Protontransfergleichgewichts überwiegend durch Änderungen von ΔS_{pt}° (im Bereich von -50 bis -110) bewirkt, d. h. die Erhöhung des Protontransfers ist primär dadurch verursacht, daß ΔS_{pt}° anwächst (d. h., da es negativ ist, betragsmäßig kleiner wird). Untersuchungen an Phenol-Amin-Komplexen [234] zeigen gerade das gegenteilige Ergebnis, bei diesen nimmt ΔS_{pt}° mit zunehmendem Protontransfer weiter ab (betragsmäßig zu), die dadurch bedingte Zunahme des Entropieterms wird durch eine umso stärkere Abnahme (betragsmäßige Zunahme) von ΔH_{pt}° überkompensiert.

Das ungewöhnliche Verhalten der Systeme, die eine Retinal-Schiffbase als Protonakzeptor enthalten, muß auf eine spezifische Eigenheit des Retinalrests zurückgeführt werden. Hierfür kommen zwei Punkte in Betracht: So kann die Polyenketten der Schiffbase im unprotonierten Zustand relativ leicht um die Einfachbindungen rotieren; in der protonierten Form sind die entsprechenden Energiebarrieren wesentlich höher, da dort die Delokalisation der Elektronen größer ist und damit die Einfachbindungen stärkeren Doppelbindungscharakter erhalten [185]. Unter der Annahme, daß ein azideres Phenol bereits in der unpolaren Grenzstruktur die Beweglichkeit der Polyenketten stärker einschränkt als ein weniger azides, wäre damit im Fall des azideren Phenols der (absolute) Entropiebetrag der unpolaren Grenzstruktur niedriger und folglich die Entropiedifferenz zwischen beiden im Gleichgewicht stehenden Strukturen dem

Betrag nach kleiner. Ein zweiter Einfluß könnte eine Wechselwirkung zwischen den π -Elektronensystemen des Phenols und des Polyens sein; auf eine solche Wechselwirkung weisen die im Vergleich zum Essigsäure-Schiffbase-System (s. u.) - in dem eine derartige Wechselwirkung nicht auftreten kann - größeren Enthalpiebeträge bei den Phenolen hin. Eine Klärung dieser Sachverhalte ist dadurch möglich, daß die Protontransfergleichgewichte in den Systemen in verschiedenen Lösungsmitteln bestimmt werden - dies erlaubt eine Auftrennung zwischen den Entropieanteilen, die durch die Wechselwirkung mit dem Medium verursacht sind, und denen, die von den an der Brücke beteiligten Gruppen herrühren - sowie durch eine ergänzende UV-spektroskopische Untersuchung, die Hinweise auf eine ev. Wechselwirkung zwischen den π -Elektronensystemen geben sollte.

Zwischen $\lg K_{rt}$ bzw. ΔG_{rt}° (bei Raumtemperatur) und ΔpK_a besteht nach der Huyskens-Gleichung ein linearer Zusammenhang. Eine analoge Linearität wurde für die Beziehungen zwischen ΔH_{rt}° bzw. ΔS_{rt}° und ΔpK_a beobachtet (s. Abb. 4.5.8); diese Relationen ermöglichten die Bestimmung der thermodynamischen Parameter auch für das System p-Kresol + Retinal-Schiffbase, die der unmittelbaren Messung nicht zugänglich sind, durch Extrapolation.

In allen Phenol-Schiffbase-Systemen beobachtet man IR-Kontinua, die die große Protonenpolarisierbarkeit der Wasserstoffbrücken zeigen (Tab. 4.5.3).

Im System *Essigsäure + Retinal-Schiffbase* (Kap. 4.6) beträgt ΔH_{rt}° -8.7 kJ/Mol, ein wie bei den Phenol-Systemen recht geringer Wert; ΔS_{rt}° beträgt -42.7 J/Mol·K. Bei den anderen Carbonsäure-Schiffbase-Systemen wurden die Protontransfergleichgewichte nur bei Raumtemperatur bestimmt (s. Tab. 4.6.1). Eine Auftragung von $\lg K_{rt}$ gegen ΔpK_a (Abb. 4.6.8) zeigt die Gültigkeit der Huyskens-Gleichung. IR-Kontinua in allen untersuchten Systemen zeigen die große Protonenpolarisierbarkeit der Brücken.

Bei den Systemen *Phenol + Acetat* (Kap. 4.7, Zusammenfassung s. Tab. 4.7.3) bestätigte sich die Hypothese, daß die Protontransfer-Entropie bei geladenen Brücken einen sehr kleinen Betrag (5 bis 20 J/Mol·K) aufweist, da die in der Umgebung der Brücke induzierte Ordnung für beide Grenzstrukturen annä-

hernd gleich groß ist. Die Werte der Protontransfer-Enthalpien sind ebenfalls betragsmäßig klein und liegen bei den betrachteten Systemen zwischen +8 und -7 kJ/Mol.

Zwischen $\lg K_{pt}$ bzw. ΔG_{pt}° und ΔpK_a besteht - wie nach der Huyskens-Gleichung zu erwarten - ein linearer Zusammenhang (s. Abb. 4.7.3); eine ähnliche Linearität wird auch für ΔH_{pt}° beobachtet. Dies ermöglichte - analog zum p-Kresol-Schiffbase-System (s. o.) - die Ermittlung der thermodynamischen Parameter des Protontransfers auch für das System p-Kresol + Acetat, die infolge der geringen Konzentration der rechten Grenzstruktur nicht unmittelbar bestimmt werden können.

Alle Phenol-Schiffbase-Systeme zeigen ausgeprägte IR-Kontinua und besitzen demzufolge große Protonenpolarisierbarkeit.

In Kap. 6.2 werden die Schlußfolgerungen, die sich aus diesen Untersuchungen an Modellsystemen bezüglich des Mechanismus des lichtinduzierten Protonentransports durch Bakteriorhodopsin ziehen lassen, im Detail dargestellt und diskutiert.

5 Zum Mechanismus der Protonenleitung

5.1 Das Molekülmodell

Da die Sequenz des Bakteriorhodopsins sowie wichtige Daten über seine räumliche Struktur bekannt sind, lag es nahe, ein Molekülmodell dieses Proteins zu bauen. Für ein solches Modell am besten geeignet sind die Molekülkalotten nach Corey, Pauling und Koltun (CPK-Modell, Ealing-Corp.), da diese nicht nur die relativen Positionen der Atomzentren wiedergeben, sondern auch den Raumbedarf der einzelnen Atome weitgehend richtig zum Ausdruck bringen ("space-filling model"). Dadurch werden unmögliche Konfigurationen, in denen etwa die einzelnen Gruppen einander durchdringen, vermieden.

Grundlage des Modells war die Einteilung der Sequenz in α -helicale Abschnitte, wie sie von Engelman et al. [40] - in unwesentlicher Modifikation zu Ovchinnikov et al. [32] - vorgeschlagen wurde. Es ist nach den Informationen, die über die räumliche Struktur des Bakteriorhodopsins vorliegen, aber nicht möglich, ein Modell zu bauen, das den Anspruch erheben kann, vollständig richtig zu sein. Selbst wenn die Unterteilung der Sequenz in α -helicale Abschnitte richtig ist, so fehlen doch definitive Angaben über die relativen Positionen der Helices und ihren Orientierungen in diesen Positionen. Ich habe aus diesem Grund nicht versucht, ein *konsistentes* Modell des ganzen Bakteriorhodopsin-Moleküls zu erstellen, sondern die einzelnen Helices allein und im Hinblick auf mögliche Kontaktstellen mit anderen Helices untersucht, wobei einige grundsätzliche Erwägungen - z. B. daß in der Sequenz benachbarte Helices keinen zu großen Abstand voneinander haben dürfen oder daß bei den Helices die hydrophoben Flächen nach Möglichkeit nach außen, also in die Lipidphase zeigen sollten [43] - zu beachten waren. Nicht in Betracht gezogen wurde die Möglichkeit, daß ein größerer Teil des Proteins ev. in β -Struktur vorliegt; die im

folgenden näher betrachteten Helices gehören jedoch nicht zu den Bereichen, die nach [31] Faltblattstruktur einnehmen sollen.

Die einzelnen helicalen Abschnitte sind i. a. nicht durchgehende, feste Stäbe; die Helices B, C und F sind von Prolin-Resten unterbrochen und an anderen Stellen können Häufungen sperriger Reste zu einer Destabilisierung der Helices führen. Gerade in der Umgebung der Proline zeigt das Protein eine erhöhte Flexibilität, die für die Reaktionsabläufe sicher nicht ohne Bedeutung ist; darüberhinaus ergeben sich an diesen Stellen deutliche Lücken im Verbund der Helices, die etwa den Retinalrest aufnehmen können.

Ergebnisse

Als erstes verdeutlichte das Modell einen Befund, der bereits aus der Betrachtung der Aminosäuresequenz zu erhalten ist: Auf mehreren Helices (B, C und E) stehen jeweils zwei Tyrosinreste auf derselben Seite der Helix. Sie sind in der Sequenz ein gerundetes Vielfaches von 3.6 - der Zahl der Aminosäurereste je Windung - voneinander entfernt und müssen sich daher auf derselben Seite befinden. Die Helices B und C passen im Modell praktisch raumfüllend so zusammen, daß sich zwischen den insgesamt vier Tyrosinresten eine Kette von Wasserstoffbrücken ausbilden kann. Auf dieses Aggregat kann nun Helix E so platziert werden, daß sich ihre beiden Tyrosinreste, die bereits untereinander eine Wasserstoffbrücke ausbilden können, in Richtung auf die zytoplasmatische (Innen-) Seite an die bestehende Kette anschließen.

Am äußeren Ende kann Glu⁷⁴ als Protonenakzeptor an die Kette angehängt werden; als Protonendonor innen kann nach dem Modell sowohl Asp¹¹⁵ auf Helix D als auch Asp²¹² auf Helix G fungieren. Eine definitive Entscheidung ist aufgrund des Modells nicht möglich, auch wenn im zweiten Fall kaum Platz für die Retinal-Schiffbase besteht, die sich auf Helix G unmittelbar neben Asp²¹² und auf der gleichen Helixseite befindet.

Diese Kette aus sieben Wasserstoffbrücken erstreckt sich etwa von der Mitte des Proteins bis knapp unter die äußere Oberfläche, ihre Länge beträgt etwas weniger als 20 Å, d. h. sie über-

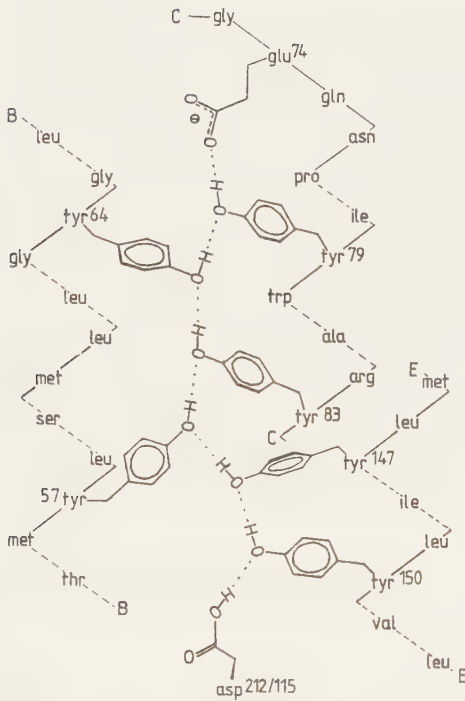


Abb. 5.1.1: Postulierte Wasserstoffbrückenkette, die als Protonenleiter vom aktiven Zentrum des Bakteriorhodopsins nach außen fungieren kann.

spannt etwa die Hälfte der Membran. Ihr inneres Ende dürfte sich ungefähr auf gleicher Höhe mit dem Chromophor befinden, der etwa im Zentrum des Proteins, vielleicht etwas näher an der zytoplasmatischen Oberfläche, liegt [53]. Damit kann diese Kette als Protonenleiter vom aktiven Zentrum nach außen fungieren; die Nachlieferung des Protons von innen hat nach einem anderen Mechanismus zu erfolgen, an dem nach einer Reihe von Arbeiten Wasser eine wichtige Rolle zu spielen scheint (s.

Kap. 5.3).

Aus einem Modell, das nach zweifellos unzureichenden Strukturdaten erstellt wurde, kann nicht definitiv auf das Vorhandensein eines genau so aufgebauten Protonenleiters geschlossen werden. Letztlich kann ein solches Modell nur dazu dienen, auf Zusammenhänge aufmerksam zu machen, die im Prinzip unmittelbar aus den experimentellen Daten gefolgert werden könnten. Insofern ist es auffällig, daß zwei in der Sequenz - und damit höchstwahrscheinlich auch in der Tertiärstruktur - benachbarte Helices jeweils zwei Tyrosine auf derselben Helixseite besitzen, und zwar jeweils gegenüber der hydrophoben Seite, die sich mit ziemlicher Sicherheit der Lipidphase zuwendet. Damit ergibt sich die Existenz einer solchen Wasserstoffbrückenkette zwischen Tyrosinresten fast zwangsläufig; wie diese Kette dann im Einzelnen aufgebaut ist, welche Gruppen sonst noch daran beteiligt sind, kann aus dem Modell nicht definitiv geschlossen werden, bestenfalls kann auf gewisse Möglichkeiten hingewiesen werden. Wie eine solche Kette als Protonenleiter fungieren kann und welche Eigenschaften sie aufweist, soll im nächsten Kapitel diskutiert werden.

5.2 Der Mechanismus

Protonenleitung kann immer verstanden werden als eine Folge von Protonentransferprozessen in Wasserstoffbrücken mit großer Protonenpolarisierbarkeit. Von Zundel wurde für die Protonenleitung in Atmungskettenproteinen eine Wasserstoffbrückenkette zwischen den Imidazolgruppen von Histidinresten diskutiert [11] (Abb. 5.2.1). Wenn eine der Imidazolgruppen protoniert ist, ist die Wasserstoffbrücke zur benachbarten Imidazolgruppe struktursymmetrisch und zeigt - wie auch aus IR-Messungen hervorgeht - große Protonenpolarisierbarkeit. Unter dem Einfluß eines elektrischen Feldes wandert die positive Ladung von Imidazol- zu Imidazolgruppe, wobei die Protonen jeweils nur innerhalb einer Wasserstoffbrücke verschoben werden. Eine solche Protonenleitung wird auch an Imidazol-Einkristallen beobachtet [244].

Ein solcher Prozeß ist ganz analog zum Grotthus-Mechanismus der Protonenleitung in Wasser und in Eis (Abb. 5.2.2). Hier

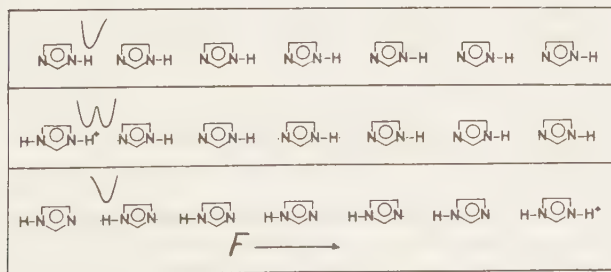


Abb. 5.2.1: Protonenleitung über eine Kette von Wasserstoffbrücken zwischen Imidazolgruppen (aus [11]).

bildet ein protoniertes Wassermolekül mit einem Nachbarn eine H_5O_2^+ -Gruppierung, in der das Proton fluktuieren kann. Durch Protontransfer in aufeinanderfolgenden Brücken kann die positive Ladung schnell über große Distanzen wandern.

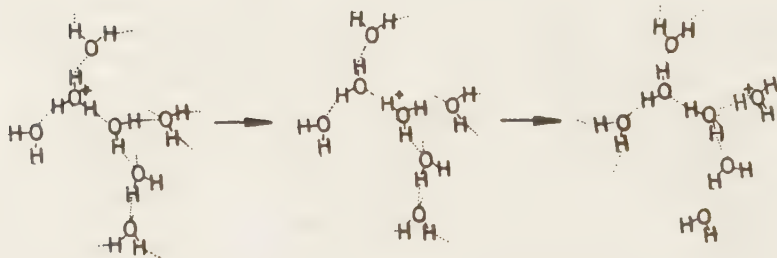


Abb. 5.2.2: Grotthus-Mechanismus der Protonenleitung in Eis.

In diesem Zusammenhang sind die Untersuchungen von Engelhardt und Riehl zur Protonenleitfähigkeit in Eis [221] von besonderem Interesse. Sie stellten fest, daß mit sinkender Temperatur die Leitfähigkeit zuerst zunimmt, um unterhalb von 100 K wieder abzunehmen. Eine Erklärung für dieses Verhalten ist darin zu sehen, daß die Protonenleitung über Ketten von Wasserstoffbrücken schneller vonstatten geht als in isolierten Brücken. In einer solchen Kette bewegen sich die Protonen korreliert – wenn auch nicht unbedingt simultan (s. u.), so doch mit geringen zeitlichen Verzögerungen. Da die Stabilität der Ketten mit abnehmender Temperatur zunimmt, nimmt auch die Protonenleitfähigkeit zu. Nach jedem Protontransferschritt müssen sich die Wassermoleküle drehen (s. Abb. 5.2.3b), damit wieder die Ausgangskonfiguration hergestellt ist. Für diese Reorientierung müssen die Wasserstoffbrücken, die die an der Protonenleitung beteiligten Wassermoleküle verbinden, aufgebrochen werden, wozu eine entsprechend hohe Aktivierungsenergie aufzuwenden ist. Aus diesem Grund nimmt die Reorientierungsrate mit abnehmender Temperatur ab, bis die Reorientierung unterhalb von 100 K schließlich geschwindigkeitsbestimmend wird.

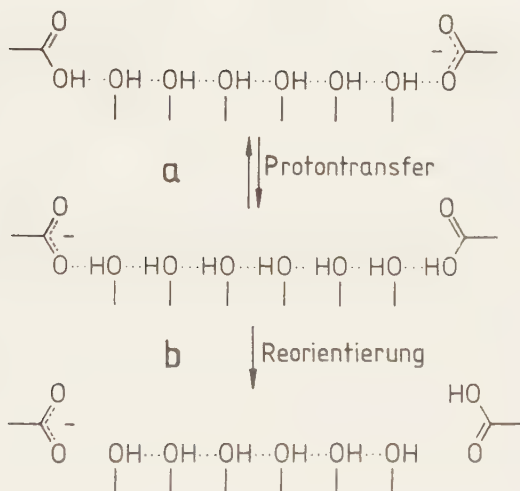


Abb. 5.2.3: Der Mechanismus der Protonenleitung in dem für Bakteriorhodopsin postulierten Wasserstoffbrückensystem.

- a) Korrelierte Protonenverschiebung; es stellt sich ein Protonentransfergleichgewicht ein, dessen Lage wesentlich von auf die Kette einwirkenden Felder bestimmt wird.
- b) Reorientierung der OH-Gruppen; zur vollständigen Wiederherstellung des Anfangszustands muß anschließend die Carbonsäuregruppe rechts an der äußeren Membranoberfläche ihr Proton an das Medium abgeben, die Carboxylatgruppe links wird im Verlauf der Photoreaktion von innen reprotoniert.

Die Untersuchungen von Engelhardt und Riehl lassen damit folgende Schlüsse zu:

1. Die Protonenleitfähigkeit nimmt mit zunehmender Länge von Wasserstoffbrückenketten zu.
2. Auch bei Temperaturen, bei denen Ketten von mehreren Wasserstoffbrücken stabil sind, wird die Protonentransportgeschwindigkeit primär von den Protonentransferschritten bestimmt, erst bei sehr tiefer Temperatur wird die Reorientie-

rung so langsam, daß sie sich auf die Protonenleitfähigkeit auswirkt.

Der Protonenleiter in Bakteriorhodopsin

Das im vorangehenden Kapitel beschriebene Wasserstoffbrückensystem dürfte stabiler sein als analoge Ketten in Wasser, da das Protein ein rigideres Gerüst bildet, so daß die Ketten bei Raumtemperatur ausreichend lange existieren sollten, um einen schnellen Ladungstransport zu gewährleisten. Wie schnell im Vergleich dazu die Reorientierung der OH-Gruppen vor sich geht, läßt sich schwer abschätzen, sie wird jedoch nicht wesentlich langsamer ablaufen als der Protontransfer.

Das transportierte Proton muß am Ende der Kette an Wasser abgegeben werden. Ein dafür ausreichendes chemisches Potential kann es praktisch nur besitzen, wenn es an eine Gruppe mit entsprechend niedrigem pK_a -Wert gebunden ist, d. h. konkret an eine Carboxylatgruppe. Damit rechtfertigt sich die vorgeschlagene Struktur des Protonenleiters nicht nur aus dem Molekülmodell, sondern auch aus theoretischen Überlegungen. Im protonenleitenden System kann sich ein Protontransferegleichgewicht zwischen den in Abb. 5.2.3a gezeigten Grenzstrukturen ausbilden.

Theoretische Untersuchungen

Um die Eigenschaften eines solchen Systems genauer zu bestimmen, wurden entsprechende quantenchemische Rechnungen ausgeführt [222]. Bisher lagen nur Untersuchungen an jeweils einer Wasserstoffbrücke - speziell am $H_5O_2^+$ -Ion - vor [201]-[204] (s. Kap. 3.2). Ab-initio-Berechnungen an Systemen, die mehrere Wasserstoffbrücken - und entsprechend viele Atome - enthalten, sind extrem aufwendig, d. h. ein System wie in Abb. 5.2.3 kann mit SCF-Verfahren nicht mit der notwendigen Genauigkeit berechnet werden. Als erster Ansatz bot sich daher die Wahl eines einfachen Modellsystems - Ameisensäure-Phenol-Formiat - an.

Zum Abschluß gebracht wurden bisher jedoch nur die Berechnungen zu einem noch etwas einfacheren System, das anstatt des Phenols ein Wassermolekül als Protonenüberträger besitzt. Im folgenden werden die Ergebnisse dieser SCF-Rechnungen dargestellt.

Abb. 5.2.4 zeigt die für das System Ameisensäure-Wasser-Formiat erhaltene Energiefläche; es ist die Gesamtenergie des Systems gegen die relativen Positionen der beiden Protonen aufgetragen. Insgesamt sind vier Grenzstrukturen denkbar:

Die Spezies, bei der sich beide Protonen am Wasser aufhalten (IV), weist eine extrem hohe Energie auf, d. h. sie tritt praktisch nicht in Erscheinung. Die drei anderen Grenzstrukturen stehen miteinander im Gleichgewicht; sie gehen über den in Abb. 5.2.5 gezeigten Reaktionsweg ineinander über. Dieser sogenannte Priamos-Paß ist der Weg niedrigster Energie von Spezies I zu Spezies II, der auch den Protonenleitungsweg darstellt. Wie aus Abb. 5.2.5 zu ersehen ist, ist dabei die Struktur, in der das Wassermolekül deprotoniert ist (III), geringfügig stabiler als die beiden anderen.

Würde als Protonenüberträger Phenol eingesetzt, so wäre ein im Prinzip ähnliches Bild zu erwarten, mit noch etwas erhöhter Stabilität für Spezies III, da dessen pK_a -Wert niedriger ist als der des Wassers; Analoges gilt für ein System mit mehreren Phenolen.

Die Rechnungen zeigen, daß die Protonenleitung *korreliert* erfolgt, d. h. die Bewegung eines Protons zieht eine Bewegung des oder der anderen Protonen nach sich; sie erfolgt jedoch *nicht simultan* (eine solche simultane Bewegung entspräche in Abb. 5.2.4 der direkten, kürzesten Verbindung zwischen I und II), sondern im wesentlichen schrittweise, wobei zuerst die *Deprotonierung* des Überträgers von der außen sitzenden Akzeptorgruppe stattfindet – und keine Protonierung von innen durch den Donor, die tatsächlich energetisch höchst ungünstig ist.

Das System als Ganzes besitzt eine sehr große Protonenpolarisierbarkeit, da die Grenzstrukturen energetisch gleichwertig sind und die Potentialbarrieren zwischen ihnen niedrig genug sind, um eine rasche Protonenbewegung zu erlauben. Die errechnete Protonenpolarisierbarkeit liegt bei $6 \cdot 10^{-21} \text{ cm}^3$ und ist damit

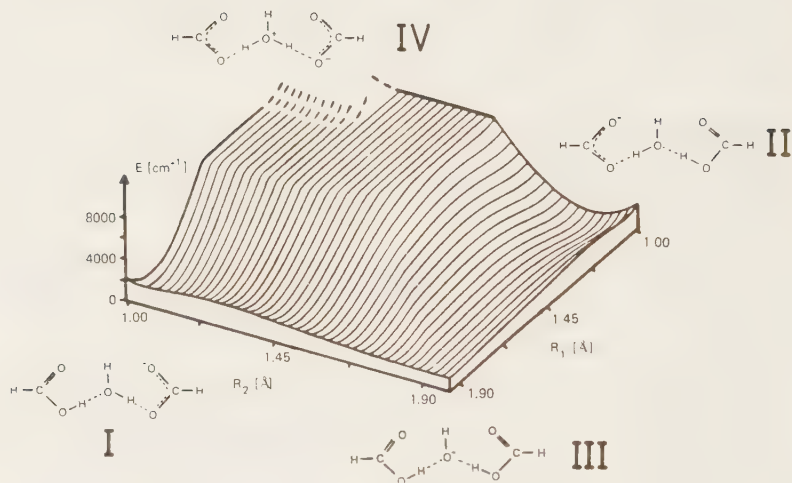


Abb. 5.2.4: Energie des Systems Ameisensäure-Wasser-Formiat in Abhängigkeit von den Lagen R_1 und R_2 der beiden Protonen in den Wasserstoffbrücken (aus [222]).

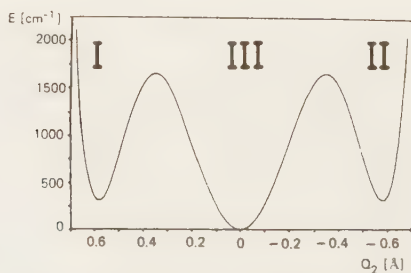


Abb. 5.2.5: Energie des Systems Ameisensäure-Wasser-Formiat entlang des Priamos-Passes als Funktion der Jacobi-Koordinate $Q_2 = 1/2 \cdot (R_1 - R_2)$ (aus [222]).

ca. 2.5 Größenordnungen größer als übliche Polarisierbarkeiten, die durch die Deformation von Elektronensystemen zustandekommen. Das heißt nun, daß bereits relativ geringe elektrische Felder das Gleichgewicht zwischen den Grenzstrukturen in die eine oder andere Richtung verschieben können. Solche Felder können in Bakteriorhodopsin von protonierten basischen Aminosäureresten - die in geringem Überschuß zwischen der inneren Oberfläche des Proteins und dem aktiven Zentrum vorhanden sind - ausgeübt werden und ermöglichen einen Ladungstransport gegen das Membranpotential. Damit ist aber die Position des Protonentransfergleichgewichts von der Ladungsverteilung innerhalb der Membran abhängig, d. h. der Protonenleitungsvorgang kann durch Ladungsverschiebungen an anderen Stellen des Proteins gesteuert werden. Solange keine Reorientierung der OH-Gruppen stattgefunden hat, kann auch die translozierte positive Ladung schnell wieder zurückgeholt werden, wie es offensichtlich bei der Belichtung von M_{412} geschieht ([115], s. Kap. 2.3).

Die nach dem Ladungstransport stattfindende Reorientierung kann thermisch erfolgen oder auch durch Konformationsänderungen des Proteins induziert werden, die ein Aufbrechen der Kette bewirken. Sofern der Reorientierungsschritt schnell genug erfolgt, können innerhalb eines photochemischen Zyklus im Prinzip auch mehrere Protonen über eine solche Kette transportiert werden.

5.3 Andere Mechanismen der Protonenleitung

Protonenleitung über Peptidbindungen

Die Idee, die $\text{NH}\cdots\text{O}=\text{C}$ -Wasserstoffbrücken, die die Amidbindungen in einer α -Helix verbinden, könnten als Protonenleiter fungieren, wird zwar von Zeit zu Zeit wieder aufgeworfen [245][246], es existiert jedoch keine experimentelle oder theoretische Grundlage für die Annahme, daß ein solcher Mechanismus tatsächlich möglich wäre. Eine Protonenleitung über Peptidbindungen muß nach allem, was man über Amidgruppierungen weiß, für höchst unwahrscheinlich erachtet werden. Um Protonenleitung zu erlauben, müßte eine Amideinheit am Sauerstoffatom der Carboxylgruppe protoniert oder am Amidstickstoff deprotoniert werden, was nach den entsprechenden pK_a -Werten im physiologischen pH-Bereich nicht möglich ist. Eine Folge von Protontransferreaktionen in mehreren $\text{NH}\cdots\text{O}=\text{C}$ -Brücken einer Helix würde energetisch ungünstige Enol-Strukturen erzeugen, die überdies für eine weitere Leitung nicht geeignet sind, da eine Reorientierung im starren Gerüst der α -Helix praktisch möglich ist.

Ein recht interessanter Vorschlag hierzu stammt von Krimm und Dwivedi [246]. Die α -Helices in Bakteriorhodopsin sind ja nach [29] etwas verzerrt, und zwar in der Weise, daß die NH-Gruppen der Peptidbindungen nicht exakt auf die $\text{O}=\text{C}$ -Gruppen der in der Helixachse folgenden Peptidbindungen ausgerichtet sind, sondern sich die Wasserstoffatome der NH-Gruppen beinahe zwischen den zwei Sauerstoffatomen benachbarter Carboxylgruppen befinden. Damit kann aber auch jede Carboxylgruppe einen Kontakt zu zwei NH-Gruppen herstellen. Unter der Annahme, daß am äußeren Ende der Helix eine NH-Gruppe deprotoniert würde, könnten Protonen entlang des Umfangs der Helix diese entlang wandern - in einer wendeltreppenartigen Bewegung -, wobei sie immer zwischen N und O weitergereicht würden. Die Aktivierungsenergie der einzelnen Transportschritte könnte hier recht niedrig sein, so daß ein derartiger Mechanismus nicht von vornherein ausgeschlossen werden kann; dennoch ist er

wohl nicht als allzu wahrscheinlich anzusehen.

Zur Rolle von Wasser

Nach experimentellen Untersuchungen ist der Wassergehalt des Bakteriorhodopsin-Moleküls nicht allzu hoch, insbesondere gibt es keine Anzeichen für eine *Wasserpore*, d. h. einen größeren wassergefüllten Bereich, der die Membran ganz oder teilweise durchdringt und als Protonenleiter dienen könnte [247][248]. Dennoch scheint Wasser für die Funktion des Bakteriorhodopsins eine wesentliche Rolle zu spielen; so bleibt der Photozyklus in der getrockneten Purpurmembra bei M_{412} stehen [83], ein Zeichen dafür, daß für die Reprotonierung des Chromophors Wasser nötig ist, und auch aus anderen Untersuchungen wird auf die Anwesenheit und spezifische Rolle von Wasser geschlossen [249]–[251]. Es gibt auch Anzeichen dafür, daß das aktive Zentrum im Verlauf des Photozyklus für das Medium zugänglich ist, da etwa die Schiffbase durch Hydroxylamin bei Belichtung zerlegt werden kann [15]. Ähnliches gilt für die Deprotonierung des Chromophors durch Hydroxylionen, die nur bei Belichtung oder bei Anwesenheit von Äther möglich ist [155].

Nach diesen Befunden ist Wasser möglicherweise für die Protonenleitung zum aktiven Zentrum hin von Bedeutung; der entsprechende Kanal öffnet sich jedoch nur nach Belichtung. Bei der Interpretation von Experimenten, bei denen getrocknete Purpurmembra untersucht wurde, ist jedoch zu berücksichtigen, daß sich in so einem Fall die Protonenkonzentrationen an den Membranoberflächen extrem stark ändern werden, sobald mit der Belichtung der Probe begonnen wird, da hier ein Abfließen der Protonen nur schlecht möglich ist und die Pufferkapazität der Gruppen an der Membranoberfläche den Protonentransport begrenzt; diese Pufferkapazität wird aber wegen der zahlreichen Carboxylgruppen an der inneren Membranoberfläche, die in Form von $-\text{COOH}\cdots\text{OOC}-$ Brücken als Protonenreservoir dienen können, relativ groß sein.

Proteinseitengruppen

Nach strukturellen Untersuchungen von Dunker und Zaleske [251] sind polare Seitengruppen von Aminosäureresten an aneinandergefügteten α -Helices in der Lage, Ketten von Wasserstoffbrücken auszubilden, die als Protonenleiter dienen können, ein Befund, der von den Untersuchungen am Molekülmodell des Bakteriorhodopsins bestätigt und konkretisiert wird (s. Kap. 5.1). über die Mechanismen, nach denen eine solche Protonenleitung über Proteinseitengruppen vonstattengeht, gibt es jedoch unterschiedliche Ansichten. Im allgemeinen wird von einem Modell ausgegangen, nach dem einzelne Gruppen bzw. Wasserstoffbrücken isoliert betrachtet werden [193]–[198]; es können in solchen Systemen *translatorische* (eine Gruppe trägt ein Proton zuviel oder zuwenig) und *rotatorische* (in einer 'Brücke' sind zwei Protonen oder keines) Defekte auftreten, deren Wanderung die eigentliche Protonenleitung darstellt. Indem für die Übergänge zwischen den verschiedenen Defekten Aktivierungsenergien angesetzt werden, läßt sich das kinetische Verhalten – etwa unter dem Einfluß eines einwirkenden elektrischen Feldes – berechnen [196]. Der Protonentransport läuft also nach einem sog. *hop/turn*-Mechanismus ab, d. h. einzelne Protonen springen in einer Brücke vom Protondonor zum Akzeptor und einzelne Gruppen führen durch Rotation eine Reorientierung des Systems herbei.

Nach [221] vermag ein solcher *hop/turn*-Mechanismus die Protonenleitung in Eis bei tiefen Temperaturen nicht zu beschreiben (s. Kap. 5.2). Sobald sich eine Kette von mehreren Wasserstoffbrücken auszubilden vermag, kommt es zu einer korrelierten Protonenbewegung, die eine höhere Protonenleitfähigkeit ermöglicht als einzelne Protonenübergänge. Eine solche korrelierte Protonenbewegung ist nur mit quantenmechanischen Verfahren theoretisch zu erfassen; diese erlauben darüberhinaus die Voraussage experimenteller Daten, speziell IR-spektroskopischer Charakteristika protonenleitender Systeme [202][204], die eine Verifizierung des Modells erlauben (sofern die technischen Voraussetzungen gegeben sind). So läßt sich etwa der Verlauf der kontinuierlichen IR-Absorption aus SCF-Daten ermitteln; die Beobachtung eines entsprechenden Kontinuums in einem Bakteriorhodopsin-Differenzspektrum wäre ein deutlicher Hinweis auf die Existenz einer protonenleitenden Kette von Wasserstoffbrücken. Ein Nachteil der quantenmechanischen Untersuchungen

ist jedoch, daß es bislang nicht möglich ist, auch die Reorientierung in die Berechnungen miteinzubeziehen.

Ob die Protonenleitung nach einem hop/turn-Mechanismus erfolgt oder über eine korrelierte Protonenbewegung, hängt davon ab, ob im biologischen Temperaturbereich größere Wasserstoffbrückensysteme stabil sind. In Wasser verschiebt sich die positive Ladung meist nur über *eine* Brücke (Strukturdiffusion der $H_5O_2^+$ -Gruppierung), da die Lebensdauer der Brücken in der weiteren Umgebung zu klein ist, so daß hier der Transport im wesentlichen nach dem hop/turn-Mechanismus erfolgen wird. In Proteinen sind die Verhältnisse etwas anders; gerade in dem sehr starren Bakteriorhodopsin-Molekül ist die Stabilität größerer Einheiten durchaus wahrscheinlich. Ein Hinweis darauf, daß größere Systeme bis hin zu Netzen von Wasserstoffbrücken in einem amorphen, aber nichtflüssigen Medium stabil sind, ergibt sich aus Untersuchungen an hydratisierten Polyamino-säure-Filmen, die Phosphationen enthalten [223]. Danach tendieren die Phosphationen dazu, große Wasserstoffbrückensysteme zu bilden, die stabil genug sind, um korrelierte Protonenfluktuationen zu erlauben, die sich in intensiven IR-Kontinua äußern.

6 Interpretation, Diskussion, Schlußfolgerungen

6.1 Feldinduzierter Protontransfer und Energieumwandlung

In Kap. 1 habe ich die Grundaspekte eines aktiven Protonentransports durch eine biologische Membran zu formulieren versucht. In diesem und den folgenden Kapiteln sollen nun mögliche Mechanismen der *Umwandlung von Lichtenergie in chemische Energie*, d. h. der Erhöhung des chemischen Potentials eines Protons, entwickelt werden, die zum einen mit den an Bakteriorhodopsin erhaltenen experimentellen Daten, zum anderen mit den in vorliegender Arbeit dargestellten eigenen Ergebnissen in Übereinstimmung stehen. Diese Energieumwandlung soll dazu führen, daß das Protein die Möglichkeit erhält, Protonen an einer Membranoberfläche an das Medium abzugeben. Ein solcher Vorgang wird dabei auch das Problem der *Vektorisierung*, d. h. der Ausrichtung der Protonenabgabe (bzw. -aufnahme) in der Weise, daß tatsächlich ein Transport zustandekommt, miteinschließen. Der Mechanismus der *Protonenleitung* wird in erster Näherung als von dem der Erhöhung des Potentials eines Protons unabhängig angesehen werden können; ein solcher Mechanismus wurde in Abschnitt 5 vorgestellt und diskutiert.

Das Kernstück eines Vorgangs, in dem das chemische Potential eines Protons erhöht wird, stellt die Übertragung dieses Protons auf eine Gruppe dar, die eine erhöhte Protondonorstärke aufweist. Dabei muß durch geeignete Maßnahmen verhindert werden, daß die Reaktion, in deren Verlauf das Proton übertragen wurde, wieder zurückläuft; es muß sich also um eine weitgehend irreversible Reaktionsfolge handeln. Die Übertragung eines Protons von einer Gruppe auf eine andere erfolgt in einer Wasserstoffbrücke; wie in vorliegender Arbeit - und in zahlreichen anderen an einer Vielzahl von Systemen (s. z. B. [213][226]-[228]) - gezeigt wurde, liegt bei einer solchen Wasserstoffbrücke ein Protontransferegleichgewicht vor, d. h. die Wasserstoffbrücke

existiert in zwei Formen (*Grenzstrukturen*), die schnell ineinander übergehen und deren Konzentrationsverhältnis eine Konstante, die Protontransfer-Gleichgewichtskonstante darstellt. Es gibt auch - bei sehr kurzen Wasserstoffbrücken - den Extremfall, daß sich ein mittlerer Zustand zwischen den beiden, nun formalen, Grenzstrukturen einstellt [200]. Bei den für Bakteriorhodopsin relevanten Brücken handelt es sich jedoch ausnahmslos um Brücken mit Doppelminimumpotential, d. h. es gibt - wie aus den IR-Spektren zu ersehen ist - jeweils zwei klar voneinander unterscheidbare Spezies.

Die Frage nach dem Mechanismus der Erhöhung des chemischen Potentials eines Protons reduziert sich so schließlich auf folgende zwei Probleme:

1. Wie wird das Protontransferegleichgewicht in der Brücke so verändert, daß das Proton zum Wasserstoffbrückenakzeptor übertritt?
2. Wie wird ein anschließendes Wiederrückgehen des Protons verhindert?

Es ist eine wesentliche Eigenschaft von Wasserstoffbrücken, deren Protonenpotential nicht zu unsymmetrisch ist, daß sie große Protonenpolarisierbarkeit aufweisen (s. Kap. 3.1). Dies heißt nichts anderes, als daß elektrische Felder relativ geringer Stärke einen Transfer des Protons in den Brücken induzieren können, also eine deutliche Änderung des Protontransferegleichgewichts zu verursachen vermögen. Damit bietet sich ein feldinduzierter Protontransfer als Grundprinzip für den Mechanismus der Energieumwandlung an. Als andere Möglichkeiten, die Übertragung eines Protons in einer Wasserstoffbrücke zu induzieren, wäre es etwa denkbar, daß die Protonendonor- bzw. -akzeptorstärke eines der Partner durch eine optische Anregung oder eine veränderte sterische Anordnung modifiziert wird. Auch in so einem Fall ist es unumgänglich, daß das Protonenpotential der unbeeinflussten Brücke nicht zu unsymmetrisch ist. Im folgenden soll auf einen Mechanismus, der einen feldinduzierten Protontransfer beinhaltet, näher eingegangen werden; viele der dargelegten Gesichtspunkte sind auch in Fällen gültig, in denen die Übertragung des Protons durch andere Effekte bewirkt wird.

Eine Protonenübertragung kann nur in einer Wasserstoffbrücke erfolgen. Dies bedeutet im wesentlichen, daß Protondonor und Protonakzeptor ausreichend geringen Abstand voneinander aufweisen müssen; dadurch wird außerdem eine Stabilisierung dieser Konfiguration erreicht, d. h. Protondonor und -akzeptor verweilen eine gewisse Zeit in dieser Konfiguration, die den Übertritt des Protons ermöglicht. Andererseits bedeutet dies, daß nach Aufbrechen der Brücke ein Rücktransfer des Protons unmöglich wird. Damit wird durch das Aufbrechen einer Brücke, in der ein Protontransfer induziert wurde, der geänderte Protonierungszustand der beiden an der Wasserstoffbrücke beteiligten Gruppen eingefroren; das System weist eine freie Enthalpie auf, die in zweifacher Hinsicht erhöht wurde: zum einen dadurch, daß nun die Gruppe mit der geringeren Protonenaffinität - damit größerer Protondonorstärke - protoniert ist, zum anderen dadurch, daß eine Wasserstoffbrücke aufgebrochen wurde, daß also die bei der Ausbildung der Brücke freiwerdende freie Enthalpie gespeichert wurde.

Ausgehend von diesen Überlegungen kann man sich den prinzipiellen Mechanismus der Umwandlung von Licht- bzw. elektrostatischer Energie in chemische Energie etwa folgendermaßen vorstellen (Abb. 6.1.1):

Im ersten Schritt wird durch ein auf die Wasserstoffbrücke einwirkendes elektrisches Feld - über dessen Ursachen noch zu sprechen sein wird - oder einen anderen Effekt (s. o.) das Protontransfergleichgewicht in der Brücke so verändert, daß das Proton zum Akzeptor übertritt (1). Anschließend, noch während der Einwirkungszeit des Feldes, bricht die Brücke infolge der thermischen Bewegung der Gruppen oder durch eine in irgendeiner Weise mit dem Entstehen des elektrischen Feldes gekoppelte Strukturänderung auf (2). Nun ist die eingespeiste freie Enthalpie im System gespeichert; nach Anschluß an den Protonenleiter bzw. dessen Endgruppe X (3) wird ein Proton an das Medium abgegeben (4). Die Reprotonierung des ursprünglichen Protondonors A von der anderen Seite der Membran über den entsprechenden protonenleitenden Abschnitt bzw. dessen Endgruppe Y (3,4), die nicht unbedingt - wie in Abb. 6.1.1 gezeigt - simultan mit der Abgabe des Protons nach außen erfolgen muß, und die anschließende Wiederausbildung der Wasserstoffbrücke zwischen AH und B⁻ (5,6) bringen das System in den Ausgangszustand zurück.

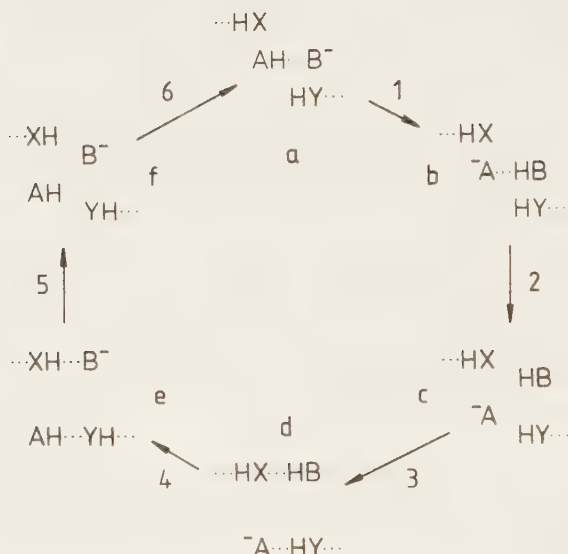


Abb. 6.1.1: Prinzipieller Reaktionsablauf bei einer feldinduzierten Protonentranslokation. X und Y sind die Endgruppen protonenleitender Ketten; in Schritt 4 wird über die bei Y endende Kette ein Proton von rechts nachgeliefert, während über die Kette bei X ein Proton nach links abgegeben wird.

Dieses Schema gibt gewissermaßen die Grunderfordernisse für einen vektoriellen Protonentransport wieder; an experimentellen Informationen gehen hier nur grundlegende Daten über die Eigenschaften von Wasserstoffbrücken ein. Die in vorliegender Arbeit dargestellten Untersuchungen an Modellsystemen zeigen, daß im Prinzip alle drei Wasserstoffbrücken, die sich zwischen Tyrosin, Asparaginsäure bzw. Aspartat und einer Retinal-Schiffbase ausbilden können, in einem solchen Mechanismus eine Rolle spielen können, da sie große Protonenpolarisierbarkeit zeigen. Die dabei umzusetzenden Energiebeträge sind je nach Art der Brücke verschieden und können anhand der vorliegen-

den - und im folgenden Kapitel nochmals zusammengefaßten - Daten abgeschätzt werden. Damit liefern die Untersuchungen an Modellsystemen ein wichtiges Instrument zur Beurteilung von Hypothesen über den Mechanismus des lichtinduzierten Protonentransports in Bakteriorhodopsin.

6.2 Schlußfolgerungen aus den Experimenten an Modellsystemen

Die thermodynamischen Parameter der Brückenbildung und des Protonentransfers, die für die untersuchten Wasserstoffbrücken erhalten wurden, sind in den Tabellen 6.2.1 und 6.2.2 nochmals zusammenfassend dargestellt; nachstehend werden mögliche Schlußfolgerungen aus diesen Daten diskutiert.

Brückenbildung

Es zeigt sich, daß bei der Ausbildung einer Wasserstoffbrücke relativ große Energiebeträge freiwerden; dies bedeutet andererseits, daß für ein Aufbrechen solcher Brücken diese Beträge zugeführt werden müssen. Die Tatsache, daß ΔS_b° negativ ist, führt dazu, daß die Brücken mit abnehmender Temperatur stabiler werden, d. h. der Betrag an freier Enthalpie, der für ein Aufbrechen eingesetzt werden muß, nimmt mit abnehmender Temperatur zu; dieser Zusammenhang bietet eine mögliche Erklärung für die Beobachtung, daß einige Zwischenstufen des Photozyklus bei tiefer Temperatur festgehalten werden (s. Kap. 2.3).

Die Brückenbildung im System p-Kresol + Acetat als Modell für eine Tyrosin-Aspartat-Wasserstoffbrücke ist so stark, daß die entsprechende Gleichgewichtskonstante nicht bestimmt werden konnte. Die für ein Aufbrechen einer solchen Brücke aufzuwendende freie Enthalpie ist demnach deutlich größer als bei den in Tab. 6.2.1 angeführten Brücken, wohl mehr als 25 kJ/Mol. Ähnliches gilt für das Aufbrechen der polaren Grenzstruktur der ungeladenen Wasserstoffbrücken, dieses ist mit einem noch größeren Energieumsatz verbunden. Dies bedeutet, daß durch die Dissoziation der polaren Grenzstruktur einer Wasserstoffbrücke ein erheblicher Energiebetrag gespeichert werden kann; eine solche Dissoziation (*Ladungstrennung*) infolge der Isomerisierung der protonierten Retinal-Schiffbase ist wahrscheinlich der

System	ΔH_b° [kJ/Mol]	ΔS_b° [J/Mol·K]	ΔG_b° (22 °C) [kJ/Mol]
Tyr-RSB	-34.8	-82.3	-10.5
Asp-RSB	-28.6	-42.7	-16.0

Tab. 6.2.1: Thermodynamische Parameter der Brückenbildung in den Systemen Tyrosin + Retinal-Schiffbase (RSB) und Asparaginsäure + Retinal-Schiffbase nach den Untersuchungen an Modellsubstanzen.

System	ΔH_{pt}° [kJ/Mol]	ΔS_{pt}° [J/Mol·K]	ΔG_{pt}° (22 °C) [kJ/Mol]
Tyr-RSB	-8.0	-107.6	23.7
Asp-RSB	-8.7	-42.7	3.9
Tyr-Asp ⁻	8	5	9.5

Tab. 6.2.2: Thermodynamische Parameter des Protontransfers in den Brücken, die sich im aktiven Zentrum von Bakteriorhodopsin ausbilden können, nach den Untersuchungen an Modellsubstanzen.

entscheidende Schritt bei der Primärreaktion des Bakteriorhodopsin-Photozyklus (s. Kap. 2.5).

Protontransfer

Bei der Betrachtung der Werte für die Brücken, die mit der Retinal-Schiffbase gebildet werden können, zeigt sich, daß in beiden Fällen (Tyrosin oder Asparaginsäure als Donor) das Gleichgewicht auf seiten der unpolaren Grenzstruktur liegt, daß also im ungestörten Gleichgewicht bei Raumtemperatur die Schiffbase mehr oder weniger deprotoniert ist. Speziell im Fall des Tyrosins ist ΔG_{pt}° sehr hoch, d. h. ein Tyrosinrest vermag

nur unter dem Einfluß eines relativ starken Feldes die Schiffbase zu protonieren bzw. eine Tyrosinatgruppe ist praktisch unabhängig von der Temperatur (s. u.) in der Lage, eine protonierte Schiffbase zu deprotonieren. In Anbetracht der im Verlauf des Photozyklus zu beobachtenden Protonierungsänderungen am Chromophor und einem Tyrosinrest (s. Kap. 2.3) muß eine Wasserstoffbrücke zwischen Tyrosin und der Schiffbase für höchst unwahrscheinlich erachtet werden.

Bei einer Asparaginsäure-Schiffbase-Brücke ist die Lage insofern anders, als hier bereits bei Raumtemperatur knapp 20 % der Protonen zur Base übergetreten sind (s. Tab. 4.6.1) und folglich bereits ein verhältnismäßig geringer äußerer Einfluß einen nahezu vollständigen Protontransfer bewirken kann. Ein solcher Einfluß könnte im aktiven Zentrum von Bakteriorhodopsin durch die zweite negative Ladung in der Nachbarschaft des Cyclohexenrings [78] ausgeübt werden, die ein die Basizität der Schiffbase erhöhendes elektrisches Feld erzeugt. Damit ist eine Wasserstoffbrücke zwischen einem Aspartatrest - wahrscheinlich Asp^{212} - und dem Chromophor nach den Untersuchungen an den Modellsystemen durchaus wahrscheinlich, sofern ein zusätzlicher Einfluß auf das Protontransferegleichgewicht in die Betrachtung miteinbezogen wird. Eine Eliminierung dieses Einflusses - z. B. die Protonierung der zweiten negativen Ladung - könnte dann den Übertritt des Protons von der Schiffbase zum Aspartat zur Folge haben, also die Deprotonierung des Chromophors (beim Übergang nach M_{412}) bewirken. Ein solcher Vorgang ist unten noch genauer diskutiert.

In einer Tyrosin-Aspartat-Brücke ist das Proton am Tyrosin lokalisiert. $\Delta G_{\text{pt}}^{\circ}$ ist klein genug, daß durch lokale Felder im Protein ein Protontransfer in dieser Wasserstoffbrücke induziert werden kann; auch das IR-Kontinuum im Modellsystem *p*-Kresol + Acetat läßt auf eine große Protonenpolarisierbarkeit schließen. Dies weist darauf hin, daß die im Photozyklus beobachtete Deprotonierung eines Tyrosinrests bei annähernd gleichzeitiger Protonierung einer Carbonsäuregruppe (s. Kap. 2.3) über einen solchen feldinduzierten Protontransfer erfolgt.

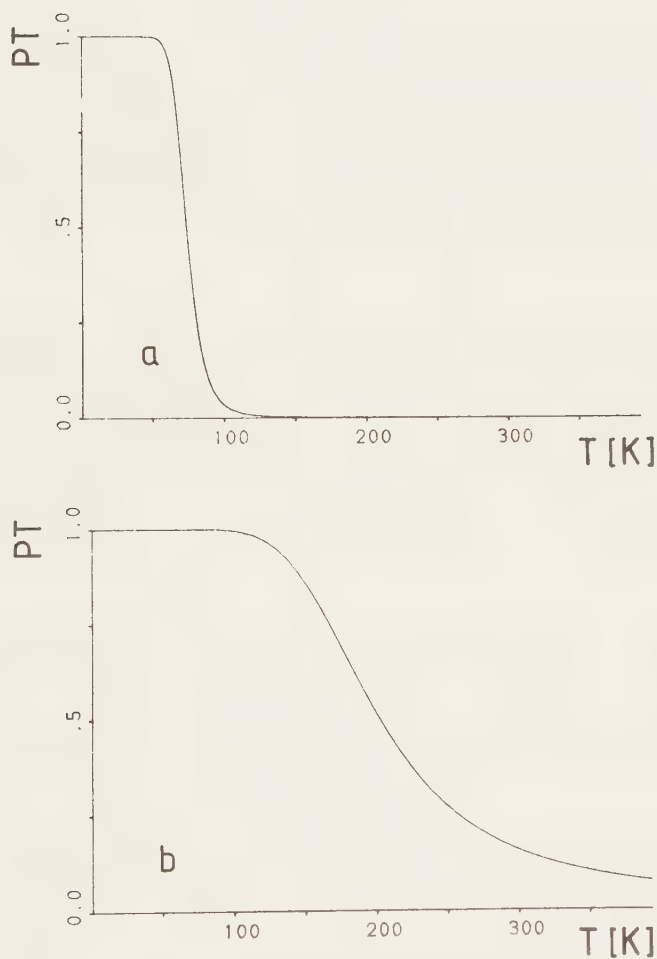


Abb. 6.2.1: Abhängigkeit des Protontransfers von der Temperatur in den Wasserstoffbrücken

a) Tyrosin + Retinal-Schiffbase,

$$\Delta H_{pt}^{\circ} = -8.0 \text{ kJ/Mol}, \Delta S_{pt}^{\circ} = -107.6 \text{ J/Mol}\cdot\text{K};$$

b) Asparaginsäure + Retinal-Schiffbase,

$$\Delta H_{pt}^{\circ} = -8.7 \text{ kJ/Mol}, \Delta S_{pt}^{\circ} = -42.7 \text{ J/Mol}\cdot\text{K}.$$

Temperaturabhängigkeit des Protontransfers

In Abb. 6.2.1 ist der Protontransfer (d. h. die relative Konzentration der polaren Grenzstruktur der Wasserstoffbrücke) in den Systemen Tyrosin und Carbonsäure + Retinal-Schiffbase in Abhängigkeit von der Temperatur gezeigt. Diese Kurven ergeben sich aus den Werten für ΔH_{pt}° und ΔS_{pt}° nach der van't-Hoff-Beziehung unter der Voraussetzung, daß diese Größen temperaturunabhängig sind [211].

In einer Tyrosin-Schiffbase-Brücke ist das Proton bis hinab zu 100 K an der Tyrosin-Seitengruppe lokalisiert und tritt dann in einem relativ schmalen Temperaturbereich zur Base über, ein Verhalten, das mit keiner experimentellen Beobachtung am Bakteriorhodopsin korreliert werden kann. Demgegenüber ist das Protontransfergleichgewicht in einer Asparaginsäure-Schiffbase-Brücke im gesamten Bereich, in dem Untersuchungen am Bakteriorhodopsin durchgeführt wurden, deutlich temperaturabhängig, wobei die Konzentration der polaren Grenzstruktur mit abnehmender Temperatur zunimmt.

Dies korreliert mit der Beobachtung, daß die Konzentration der Photozyklus-Zwischenstufe M_{412} - bei der der Chromophor deprotoniert vorliegt - stark von der Temperatur abhängt [59][60]. Die Ausbeute an M_{412} , also der deprotonierten Schiffbase, nimmt dabei mit abnehmender Temperatur ab, da ein Teil der Bakteriorhodopsin-Moleküle von L_{550} direkt nach BR_{570} reagiert. Dies kann so interpretiert werden, daß sich kurzzeitig ein Protontransfergleichgewicht zwischen der protonierten Schiffbase und dem Akzeptor einstellt, das eine entsprechende Temperaturabhängigkeit aufweist. Zweifellos kann die Bildungskonstante einer Zwischenstufe in einem Reaktionsablauf nicht allein über Gleichgewichte beschrieben werden, vielmehr gehen hier auch die Reaktionsgeschwindigkeiten, mit denen die an den Gleichgewichten beteiligten Spezies gebildet werden und zerfallen, mit ein, und die Geschwindigkeitskonstanten sind ebenfalls temperaturabhängig. Dennoch kann die Übereinstimmung zwischen den Modellexperimenten und den Beobachtungen an Bakteriorhodopsin als Hinweis darauf gewertet werden, daß die Schiffbase von einer Carboxylatgruppe deprotoniert wird, wobei das Ausmaß, mit dem der eine oder andere der beiden Reaktionswege eingeschlagen wird, zumindest zum Teil vom Protontransfergleichgewicht zwischen Carbonsäure und Schiffbase bestimmt

wird.

Im System Tyrosin + Carboxylat (ohne Abbildung) liegt der Protontransfer für alle Temperaturen kleiner als etwa 300 K praktisch bei Null und steigt dann in Richtung auf höhere Temperaturen langsam an; man kann demzufolge von einer Temperaturunabhängigkeit des Protontransfers in dieser Brücke im üblichen Temperaturbereich ausgehen.

Zusammenfassung

Obige Schlußfolgerungen lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

1. Zum Aufbrechen von Wasserstoffbrücken sind freie Enthalpien von 10 bis ca. 30 kJ/Mol aufzuwenden; entsprechende Energiebeträge können demzufolge durch das Aufbrechen von Brücken gespeichert werden und werden bei der Ausbildung der Brücken freigesetzt.
2. Das Gegenion der protonierten Schiffbase ist eine Carboxylatgruppe (wahrscheinlich Aspartat); das Protontransfergleichgewicht in der Asp-RSB-Brücke ist durch die negative Ladung am Cyclohexenring zugunsten der polaren Grenzstruktur verschoben. Es gibt keinerlei Anzeichen, daß die Schiffbase unmittelbar mit einer Tyrosin-Seitengruppe verknüpft ist; auch im Verlauf des Photozyklus tritt eine solche Verknüpfung nicht auf.
3. In einer Tyrosin-Carboxylat-Brücke ist das Proton am Tyrosin lokalisiert, kann aber durch ein lokales elektrisches Feld zum Carboxylat verschoben werden; dabei werden (ohne Dissoziation der Brücke) 8 bis 10 kJ/Mol gespeichert. Ein Protontransfer von Tyrosin zur negativen Ladung am Cyclohexenring kann die Deprotonierung der Schiffbase bei der Bildung von M_{412} induzieren.
4. Die Deprotonierung des Chromophors erfolgt durch eine Carboxylatgruppe. Das entsprechende Protontransfergleichgewicht ist stark temperaturabhängig; mit abnehmender Temperatur wird aus diesem Grund bevorzugt ein Reaktionsweg eingeschlagen, bei dem die Schiffbase nicht deprotoniert wird.

Sinngemäß lassen sich diese Ergebnisse auch auf die Photoreaktion des Rhodopsins anwenden; auch dort dürfte es sich beim Gegenion des Chromophors (ebenfalls eine protonierte Retinal-Schiffbase) um eine Aspartatgruppe handeln und im lichtinduzierten Reaktionsverlauf kommt es - beim Übergang von Metarhodopsin-I zu Metarhodopsin-II - zur Deprotonierung der Schiffbase [6]-[9], für die eine analoge Temperaturabhängigkeit wie bei Bakteriorhodopsin zu beobachten ist [253].

Über diese konkreten Schlußfolgerungen hinaus erlauben die in den Tabellen 6.2.1 und 6.2.2 zusammengefaßten Daten, mechanistische Modelle für die Photoreaktion des Bakteriorhodopsins im Hinblick auf die zu erwartenden Entahpie- und Entropieumsetzungen zu beurteilen.

6.3 Der Mechanismus der lichtinduzierten Protonentranslokation: Möglichkeiten einer Klärung

Nach neuesten Untersuchungen im Femtosekundenbereich kann als gesichert gelten, daß im Primärschritt der Photoreaktion von Bakteriorhodopsin ($BR_{570} \rightarrow J_{505}$) im wesentlichen nur die Isomerisierung der Retinal-Schiffbase stattfindet [87][88]. Damit dürfte die Lichtenergie zum großen Teil in Form einer Ladungstrennung zwischen der protonierten Schiffbase und ihrem Gegenion gespeichert werden [91][92][100], wobei ein Teil der Energie auch zum Aufbau einer konformationellen Spannung des Proteins verwendet wird [100]. Diese Spannung kann in nachfolgenden Protonentranslokationsschritten die für das Aufbrechen von Wasserstoffbrücken nötige Energie liefern.

Anzeichen für Protontransferreaktionen gibt es für den Übergang von K_{590} nach L_{550} [130], für nachfolgende Reaktionsschritte sind Protonierungsänderungen verbürgt (s. Kap. 4.3). Bei diesen Reaktionen handelt es sich im wesentlichen um Protonenübertragungen von Tyrosin und von der protonierten Schiffbase jeweils auf Aspartat, wobei letztere Reaktion als unmittelbare Folge der ersteren verstanden werden kann (s. Kap. 6.2). Wie diese Protontransferreaktionen nun vom Primärprozeß bzw. dem dabei aufgebauten elektrischen Feld im Einzelnen induziert werden, ist noch unklar; für eine genaue Aufklärung der Zusammenhänge sind detailliertere Informationen über die Struktur des aktiven Zentrums und die an ihm beteiligten Gruppen notwendig. Insbesondere muß geklärt werden, ob die Aspartatgruppe, die den Chromophor deprotoniert, dieselbe ist wie die, die im Grundzustand das Gegenion der protonierten Schiffbase darstellt, von welcher Gruppe die negative Ladung am Cyclohexenring stammt und ob diese Protonierungsänderungen erfährt. Aus diesem Grund sind genaue Kenntnisse über die Aminosäure-Seitengruppen, die an den Prozessen beteiligt sind, unumgänglich; auch können molekulare Modelle, die die relativen Positionen der Gruppen zeigen, nur erstellt werden, wenn die Gruppen einzelnen Aminosäuren in der Sequenz zugeordnet

worden sind.

Eine solche Zuordnung ist möglich durch spezifische chemische Modifikationen, Einsatz isotopenmarkierter Aminosäuren und den genetischen Austausch einzelner Aminosäuren (*protein engineering* [254]). Die entsprechend modifizierten Proteine sind dann im Hinblick auf ihre photochemische Aktivität sowie mit den bewährten spektroskopischen Verfahren zu untersuchen. Eine besondere Bedeutung kommt dabei der IR-Differenzspektroskopie - speziell der Fouriertransform-Spektroskopie (FTIR) - zu, da sie eine der wenigen Methoden ist, die die Veränderungen an einzelnen Proteinseitengruppen im Reaktionsablauf sichtbar machen können. Unterschiede in den Differenzspektren modifizierter und unmodifizierter Proben ermöglichen die Identifikation der beteiligten Gruppen und zeigen, wie sie untereinander verknüpft sind und an welchen Vorgängen sie beteiligt sind. Gerade die Tatsache, daß Membranproteine nur in Ausnahmefällen kristallisiert werden können und so kristallographische Daten i. a. nicht zur Verfügung stehen, macht die umfassende Anwendung der FTIR-Spektroskopie auf diesem Gebiet besonders wichtig.

Auch für die Aufklärung des Mechanismus der Protonenleitung kann die IR-Differenzspektroskopie einen wertvollen Beitrag leisten. Dabei ist jedoch ein besonderes Vorgehen erforderlich. Zwar sollten sich die an einem protonenleitenden System in Bakteriorhodopsin beteiligten Gruppen mit den oben beschriebenen Methoden identifizieren lassen, doch ermöglicht dies noch keine Aussage über den mechanistischen Ablauf der Protonenleitung, speziell läßt sich hiermit nicht zwischen hop/turn-Mechanismus und korrelierter Protonenbewegung unterscheiden. Ein Protonenleiter, wie er in den Kapiteln 5.1 und 5.2 beschrieben wurde, sollte sich durch eine kontinuierliche Absorption im IR-Spektrum äußern (s. Kap. 2.3). Diese Absorption wird nur auftreten, solange der Protonenleiter in seiner aktiven Form (entsprechend Abb. 5.2.3a) vorliegt, d. h. die kontinuierliche Absorption sollte sich im Verlauf des Photozyklus ändern und daher in Differenzspektren feststellbar sein. Dabei ist folgendes zu beachten:

1. Um eine sichere Interpretation zu ermöglichen, muß der spektrale Verlauf des Kontinuums der postulierten Wasserstoffbrückenkette bekannt sein. Mit theoretischen Methoden (s.

Kap. 2.3 und 5.2) ist dieser Verlauf zumindest angenähert zu berechnen.

2. Die Aufnahme der Spektren muß mit höchster Präzision erfolgen, d. h. die Verwendung der Fouriertransform-Technik ist unverzichtbar. Dabei ist auf äußerste Konstanz der Basislinie zu achten, um Artefakte auszuschließen.
3. Es besteht die Möglichkeit, daß sich der Protonenleiter nur kurzzeitig beim Übergang zwischen zwei Intermediaten (etwa L_{550} und M_{412}) ausbildet und demzufolge in festgehaltenen Zwischenstufen nicht beobachtet werden kann. Die Untersuchungen mit statischer FTIR-Spektroskopie sind dann durch entsprechende kinetische Messungen (s. [132][133]) zu ergänzen.

7 Zusammenfassung

Bakteriorhodopsin ist die wesentliche Proteinkomponente in der Purpurmembran von Halobakterien; seine Funktion besteht darin, bei Belichtung Protonen über diese Membran hinweg von innen nach außen zu transportieren und so einen Teil der Lichtenergie in elektrochemische Energie umzuwandeln. Um eine physikalisch-chemische Basis für das Verständnis der molekularen Abläufe bei dieser Photoreaktion zu schaffen, wurden in vorliegender Arbeit wichtige Eigenschaften von Wasserstoffbrücken, die sich im aktiven Zentrum von Bakteriorhodopsin ausbilden können, ermittelt. Durch IR-spektroskopische Untersuchungen an einfachen Modellsystemen wurden für diese Brücken die thermodynamischen Parameter ΔH° und ΔS° für die Ausbildung der Brücken und den Protonentransfer in ihnen bestimmt. (Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in den Tabellen 6.2.1 und 6.2.2 zusammengefaßt.)

Die Arbeit zeigt, daß speziell Wasserstoffbrücken zwischen der Seitengruppe eines Tyrosinrests und einer Carboxylatgruppe (wahrscheinlich Aspartat) sowie zwischen einer Carbonsäuregruppe (Asparaginsäure) und dem Chromophor des Bakteriorhodopsins, einer Retinal-Schiffbase, bei der Umwandlung von Lichtenergie in elektrochemische Energie von Bedeutung sind, da diese Brücken große Protonenpolarisierbarkeit besitzen und somit die Voraussetzung für die Beteiligung an einer feldinduzierten Protonentranslokation erfüllen (Kap. 6.1). Auch Literaturdaten über Bakteriorhodopsin weisen auf eine wichtige Rolle dieser Wasserstoffbrücken hin; die Ergebnisse vorliegender Arbeit ermöglichen eine sinnvolle Interpretation einer Reihe experimenteller Beobachtungen an Bakteriorhodopsin (Kap. 6.2). Die bei entsprechenden Protonentranslokationsreaktionen umgesetzten Energiebeträge lassen sich anhand der in dieser Arbeit gewonnenen Daten abschätzen.

Ein Molekülmodell des Bakteriorhodopsins legt es nahe, daß sich in diesem Protein eine Kette von Wasserstoffbrücken zwischen einem Asparaginsäure-, sechs Tyrosin- und einem Glutamatrest

ausbilden kann (Kap. 5.1). Eine solche Kette vermag Protonen sehr rasch zu leiten und könnte den Protonenleiter vom aktiven Zentrum des Bakteriorhodopsins zur äußeren Membranoberfläche konstituieren (Kap. 5.2).

Literaturverzeichnis

1. P. Mitchell. *Chemiosmotic Coupling and Energy Transduction*, Glynn Research Laboratories, Bodmin, Cornwall (1970).
2. A.L. Lehninger. *Bioenergetik*, G. Thieme Verl., Stuttgart (1970).
3. D. Oesterhelt. *Angew. Chemie* **88**, 16-24 (1976).
Bacteriorhodopsin als Beispiel einer lichtgetriebenen Protonenpumpe.
4. W. Stoeckenius, R.A. Bogomolni. *Ann. Rev. Biochem.* **52**, 587-616 (1982).
Bacteriorhodopsin and Related Pigments of Halobacteria.
5. D.F. O'Brien. *Science* **218**, 961-966 (1982).
The Chemistry of Vision.
6. V.P. Skulachev. *FEBS Letters* **146**, 244-253 (1982).
The Dual Role of Rhodopsin in Vision: Light-driven Charge Translocation and Formation of Long-lived Photoproducts.
7. L.A. Drachev, G.R. Kalamkarov, A.D. Kaulen, M.A. Ostrovsky, V.P. Skulachev. *FEBS Letters* **119**, 125-131 (1980).
Animal Rhodopsin as a Photogenerator of an Electric Potential that increases Photoreceptor Membrane Permeability.
8. Yu.A. Ovchinnikov, H.G. Abdulaev, M.Yu. Feigina, I.D. Artamonov, A.S. Bogachuk, A.S. Zolotarev, E.R. Eganyan, P.V. Kostetsky. *Bioorg. Khimia* **9**, 1331-1340 (1983).
Visual Rhodopsin. III. Total Amino Acid Sequence and Arrangement in the Membrane.
9. Yu.A. Ovchinnikov. *FEBS Letters* **148**, 179-191 (1982).
Rhodopsin and Bacteriorhodopsin: Structure-Function Relationships.
10. P.A. Hargrave, J.H. McDowell, D.R. Curtis, J.K. Wang, E. Juszczak, S.-L. Fong, J.K.M. Rao, P. Argos. *Biohys. Struct. Mech.* **9**, 235-244 (1983).
The Structure of Bovine Rhodopsin.
11. G. Zundel. *W. Hoppe et al. (eds.) Biophysik*, 253-265 (1982).
Polare Wechselwirkungen, Hydratation, Protonenleitung und Konformation biologischer Systeme - Ergebnisse infrarotspektroskopischer Untersuchungen.
12. G. Zundel. *J. Mol. Structure* **45**, 55-73 (1978).
The Charge Relay System in Chymotrypsin - IR Studies of Models for the Hydrogen Bond.
13. S.N. Vinogradov, R.A. Hudson, R.M. Scott. *Biochim. Biophys. Acta* **214**, 6-27 (1970).
Models of Intermolecular Interactions involving Proton Transfer in Biopolymers.
14. D. Oesterhelt, W. Stoeckenius. *Methods in Enzymology* **31**, 667-678 (1974).
Isolation of the Cell Membrane of *Halobacterium halobium* and its Fractionation into Red and Purple Membrane.

15. D. Oesterhelt, W. Stoeckenius. *Nature New Biol.* **233**, 149-152 (1971). Rhodopsin-like Protein from the Purple membrane of *Halobacterium halobium*.
16. W. Sperling, C.N. Rafferty, K.-D. Kohl, N.A. Dencher. *FEBS Letters* **97**, 129-132 (1979). Isomeric Composition of Bacteriorhodopsin under Different Environmental Light Conditions.
17. G.S. Harbison, S.O. Smith, J.A. Pardo, C. Winkel, J. Lugtenburg, J. Herzfeld, R. Mathies, R.G. Griffin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 1706-1709 (1984). Dark-adapted Bacteriorhodopsin Contains 13-cis, 15-syn and all-trans, 15-anti Retinal Schiff Bases.
18. H.V. Westerhoff, Z. Dancshazy. *Trends Biochem. Sci.* **9**, 112-117 (1984). Keeping a Light-driven Proton Pump under Control.
19. J.L. Spudis, R.A. Bogomolni. *Biophys. J.* **43**, 243-246 (1983). Spectroscopic Discrimination of the three Rhodopsinlike Pigments in *Halobacterium Halobium* Membranes.
20. N. Hazemoto, N. Kamo, Y. Terayama, Y. Kobatake, M. Tsuda. *Biophys. J.* **44**, 59-64 (1983). Photochemistry of two Rhodopsinlike Pigments in Bacteriorhodopsin-free Mutant of *Halobacterium Halobium*.
21. R. Henderson, P.N.T. Unwin. *Nature* **257**, 28-32 (1975). Three-dimensional Model of Purple Membrane Obtained by Electron Microscopy.
22. R. Henderson. *J. Mol. Biol.* **93**, 123-138 (1975). The Structure of the Purple Membrane from *Halobacterium halobium*: Analysis of the X-ray Diffraction Pattern.
23. A.E. Blaurock. *J. Mol. Biol.* **93**, 139-158 (1975). Bacteriorhodopsin: A Trans-membrane Pump Containing alpha-Helix.
24. S.B. Hayward, R.M. Stroud. *J. Mol. Biol.* **151**, 419-517 (1981). Projected Structure of Purple Membrane Determined to 3.7Å Resolution by Low Temperature Electron Microscopy.
25. H. Michel, D. Oesterhelt. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 1283-1285 (1980). Three-dimensional Crystals of Membrane Proteins: Bacteriorhodopsin.
26. R. Henderson, D. Shotton. *J. Mol. Biol.* **139**, 99-109 (1980). Crystallisation of Purple Membrane in Three Dimensions.
27. H. Michel. *EMBO J.* **1**, 1267-1271 (1982). Characterization and Crystal Packing of Three-dimensional Bacteriorhodopsin Crystals.

28. D.D. Muccio, J.Y. Cassim. *Biophys. J.* **26**, 427-440 (1979).
Interpretation of the Absorption and Circular Dichroic Spectra of Oriented Purple Membrane Films.
29. K.J. Rothschild, N.A. Clark. *Science* **204**, 311-312 (1979).
Anomalous Amide I Infrared Absorption of Purple Membrane.
30. K.J. Rothschild, N.A. Clark. *Biophys. J.* **25**, 473-488 (1979).
Polarized Infrared Spectroscopy of Oriented Purple Membrane.
31. B.K. Jap, M.F. Maestre, S.B. Hayward, R.M. Glaeser. *Biophys. J.* **43**, 81-89 (1983).
Peptide-chain Secondary Structure of Bacteriorhodopsin.
32. Yu.A. Ovchinnikov, N.G. Abdulaev, M.Yu. Feigina, A.V. Kiselev, N.A. Lobanov. *FEBS Letters* **100**, 219-224 (1979).
The Structural Basis of the Functioning of Bacteriorhodopsin: an Overview.
33. H.G. Khorana, G.E. Gerber, W.C. Herlihy, C.P. Gray, R.J. Anderegg, K. Nihel, K. Biemann. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 5046-5050 (1979).
Amino Acid Sequence of Bacteriorhodopsin.
34. W.C. Herlihy, R.J. Anderegg, K. Biemann. *Biomed. Mass Spectrom.* **8**, 62-69 (1981).
Advances in Gas Chromatographic Mass Spectrometric Protein Sequencing. 2-Application to Membrane Proteins.
35. R. Dunn, J. McCoy, M. Simsek, A. Majumdar, S.H. Chang, U.L. RajBandary, H.G. Khorana. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 6744-6748 (1981).
The Bacteriorhodopsin Gene.
36. M.-J. Liao, K.-S. Huang, H.G. Khorana. *J. Biol. Chem.* **259**, 4200-4204 (1984).
Regeneration of Native Bacteriorhodopsin Structure from Fragments.
37. N.V. Katre, R.M. Stroud. *FEBS Letters* **136**, 170-174 (1981).
A Probable Linking Sequence between two Transmembrane Components of Bacteriorhodopsin.
38. K. Kimura, T.L. Mason, H.G. Khorana. *J. Biol. Chem.* **257**, 2859-2867 (1982).
Immunological Probes for Bacteriorhodopsin. Identification of three Distinct Antigenic Sites on the Cytoplasmic Surface.
39. Yu.A. Ovchinnikov. *Biopolymers* **24**, 157-166 (1985).
Membrane Proteins as Light-Energy Transducers.
40. D. M. Engelman, R. Henderson, A.D. McLachlan, B.A. Wallace. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 2023-2027 (1980).
Path of the Polypeptide in Bacteriorhodopsin.
41. D.A. Agard, R.M. Stroud. *Biophys. J.* **37**, 589-602 (1982).
Linking Regions between Helices in Bacteriorhodopsin Revealed.

42. J. Trewhella, S. Anderson, R. Fox, E. Gogol, S. Khan, D. Engelman, G. Zaccai. *Biophys. J.* **42**, 233-241 (1983).
Assignment of Segments of the Bacteriorhodopsin Sequence to Positions in the Structural Map.
43. D.M. Engelman, G. Zaccai. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 5894-5898 (1980).
Bacteriorhodopsin is an Inside-out Protein.
44. N.V. Katre, J. Finer-Moore, R.M. Stroud, S.B. Hayward. *Biophys. J.* **46**, 195-204 (1984).
Location of an Extrinsic Label in the Primary and Tertiary Structure of Bacteriorhodopsin.
45. H.-D. Lemke, D. Desterhelt. *FEBS Letters* **128**, 255-260 (1981).
Lysine 216 is a Binding Site of the Retinyl Moiety in Bacteriorhodopsin.
46. N.V. Katre, P.K. Wolber, W. Stoeckenius, R.M. Stroud. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 4068-4072 (1981).
Attachment Site(s) of Retinal in Bacteriorhodopsin.
47. E. Mullen, A.H. Johnson, M. Akhtar. *FEBS Letters* **130**, 187-193 (1981).
The Identification of Lys216 as the Retinal Binding Residue in Bacteriorhodopsin.
48. H. Bayley, K.-S. Huang, R. Radhakrishnan, A.H. Ross, Y. Takagaki, H.G. Khorana. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 2225-2229 (1981).
Site of Attachment of Retinal in Bacteriorhodopsin.
49. K.J. Rothschild, P.V. Argade, T.N. Earnest, K.-S. Huang, E. London, M.-J. Liao, H. Bayley, H.G. Khorana, J. Herzfeld. *J. Biol. Chem.* **257**, 8592-8595 (1982).
The Site of Attachment of Retinal in Bacteriorhodopsin. A Resonance Raman Study.
50. T.G. Ebrey, B. Becher, B. Mao, P. Kilbride. *J. Mol. Biol.* **112**, 377-397 (1977).
Exciton Interactions and Chromophore Orientation in the Purple Membrane.
51. W. Hoffmann, C.J. Restall, R. Hyla, D. Chapman. *Biochim. Biophys. Acta* **602**, 531-538 (1980).
Protein Rotation and Chromophore Orientation in Reconstituted Bacteriorhodopsin Vesicles.
52. E. Bamberg, H.-J. Apell, N.A. Dencher, W. Sperling, H. Stieve, P. Luger. *Biophys. Struct. Mech.* **5**, 277-292 (1979).
Photocurrents Generated by Bacteriorhodopsin on Planar Bilayer Membranes.
53. G.I. King, W. Stoeckenius, H.L. Crespi, B.P. Schoenborn. *J. Mol. Biol.* **130**, 395-404 (1979).
The Location of Retinal in the Purple Membrane Profile by Neutron Diffraction.

54. T. Kouyama, Y. Kimura, K. Kinoshita, A. Ikegami. *FEBS Letters* **124**, 100-104 (1981).
Immobility of the Chromophore in Bacteriorhodopsin.
55. J.S. Jubb, D.L. Worcester, H.L. Crespi, G. Zaccai. *EMBO J.* **3**, 1455-1461 (1984).
Retinal Location in Purple Membrane of *Halobacterium halobium*: a Neutron Diffraction Study of Membranes Labelled in vivo with Deuterated Retinal.
56. G.I. King, P.C. Mowery, W. Stoeckenius, H.L. Crespi, B.P. Schoenborn. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 4726-4730 (1980).
Location of the Chromophore in Bacteriorhodopsin.
57. R.H. Lozier, R.A. Bogomolni, W. Stoeckenius. *Biophys. J.* **15**, 955-962 (1975).
Bacteriorhodopsin: A Light-driven Proton Pump in *Halobacterium halobium*.
58. K. Ohno, Y. Takeuchi, M. Yoshida. *Photochem. Photobiol.* **33**, 573-578 (1981).
On the two Forms of Intermediate M of Bacteriorhodopsin.
59. T. Iwasa, F. Tokunaga, T. Yoshizawa. *Biophys. Struct. Mech.* **6**, 253-270 (1980).
A New Pathway in the Photoreaction Cycle of Trans-Bacteriorhodopsin and the Absorption Spectra of its Intermediates.
60. D. Kalisky, M. Ottolenghi. *Photochem. Photobiol.* **35**, 109-115 (1982).
Branching Pathways in the Photocycle of Bacteriorhodopsin.
61. K. Ohno, R. Govindjee, T.G. Ebrey. *Biophys. J.* **43**, 251-254 (1983).
Blue Light Effect on Proton Pumping by Bacteriorhodopsin.
62. J.B. Hurley, B. Becher, T.G. Ebrey. *Nature* **272**, 87-88 (1978).
More Evidence that Light Isomerises the Chromophore of Purple Membrane Protein.
63. J.F. Nagle, L.A. Parodi, R.H. Lozier. *Biophys. J.* **38**, 161-147 (1982).
Procedure for Testing Kinetic Models of the Photocycle of Bacteriorhodopsin.
64. R.H. Lozier, W. Niederberger, M. Ottolenghi, G. Sivorinovski, W. Stoeckenius. *S.R. Caplan & M. Ginzburg (eds.) Energetics and Structure of Halophilic Microorganisms*, Elsevier/North-Holland, 123-141 (1978).
On the Photocycles of Light- and Dark-Adapted Bacteriorhodopsin.
65. R. Casadio, W. Stoeckenius. *Biochem.* **19**, 3374-3381 (1980).
Effect of Protein-Protein Interaction on Light Adaptation of Bacteriorhodopsin.

66. S.O. Smith, A.B. Myers, J.A. Pardoën, C. Winkel, P.P.J. Mulder, J. Lugtenburg, R. Mathies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 2055-1059 (1984).
Determination of Retinal Schiff Base Configuration in Bacteriorhodopsin.
67. M. Tsuda, M. Glaccum, B. Nelson, T.G. Ebrey. *Nature* **287**, 351-353 (1980).
Light Isomerizes the Chromophore of Bacteriorhodopsin.
68. P.C. Mowery, W. Stoeckenius. *Biochem.* **20**, 2302-2306 (1981).
Photoisomerization of the Chromophore in Bacteriorhodopsin during the Proton Pumping Photocycle.
69. D. Kuschmitz, B. Hess. *FEBS Letters* **138**, 137-140 (1982).
Trans-cis Isomerisation of the Retinal Chromophore of Bacteriorhodopsin during the Photocycle.
70. C.-L. Hsieh, M. Nagumo, M. Nicol, M.A. El-Sayed. *J. Phys. Chem.* **85**, 2714-2717 (1981).
Picosecond and Nanosecond Resonance Raman Studies of Bacteriorhodopsin. Do Configurational Changes of Retinal Occur in Picoseconds?
71. B. Karvaly, J.M. Fukumoto, W.D. Hopewell, M.A. El-Sayed. *J. Phys. Chem.* **86**, 1899-1908 (1982).
Polarized Photochemistry on Bacteriorhodopsin. Dichroism of the Early Photochemical Intermediate K610.
72. C.-L. Hsieh, M.A. El-Sayed, M. Nicol, M. Nagumo, J.-H. Lee. *Photochem. Photobiol.* **38**, 83-94 (1983).
Time-resolved Resonance Raman Spectroscopy of the Bacteriorhodopsin Photocycle on the Picosecond and Nanosecond Time Scales.
73. J. Pande, R.H. Callender, T.G. Ebrey. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 7379-7382 (1981).
Resonance Raman Study of the Primary Photochemistry of Bacteriorhodopsin.
74. M. Braiman, R. Mathies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 403-407 (1982).
Resonance Raman Spectra of Bacteriorhodopsin's Primary Photoproduct: Evidence for a Distorted 13-cis Retinal Chromophore.
75. A. Lewis, J. Spoonhower, R.A. Bogomolni, R.H. Lozier, W. Stoeckenius. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **71**, 4462-4466 (1974).
Tunable Laser Resonance Raman Spectroscopy of Bacteriorhodopsin.
76. M.A. Marcus, A. Lewis. *Biochem.* **17**, 4722-4735 (1978).
Resonance Raman Spectroscopy of the Retinylidene Chromophore in Bacteriorhodopsin (bR570), bR560, M412, and Other Intermediates: Structural Conclusions Based on Kinetics, Analogues, Models and Isotopically Labeled Membranes.

77. M.A. Marcus, A. Lewis. *Science* **195**, 1328-1330 (1977).
Kinetic Resonance Raman Spectroscopy: Dynamics of Deprotonation of the Schiff Base of Bacteriorhodopsin.
78. K. Nakanishi, V. Balogh-Nair, M. Arnaboldi, K. Tsujimoto, B. Honig. *J. Amer. Chem. Soc.* **102**, 7945-7947 (1980).
An External Point-Charge Model for Bacteriorhodopsin to Account for its Purple Color.
79. T. Kakitani, H. Kakitani, B. Honig, K. Nakanishi. *J. Amer. Chem. Soc.* **105**, 648-650 (1983).
Symmetric Charge Distribution in the Bacteriorhodopsin Binding Site.
80. F. Derguini, C.G. Caldwell, M.G. Motto, B. Balogh-Nair, K. Nakanishi. *J. Amer. Chem. Soc.* **105**, 646-648 (1983).
Bacteriorhodopsins Containing Cyanine Dye Chromophores. Support for the External Point-Charge Model.
81. B. Mao. *Photochem. Photobiol.* **33**, 407-411 (1981).
Thermal Decay of the Bathoproduct of Bacteriorhodopsin.
82. D.L. Narva, R.H. Callender, T.G. Ebrey. *Photochem. Photobiol.* **33**, 567-571 (1981).
Low Temperature Resonance Raman Study of the L Intermediate of Bacteriorhodopsin.
83. R. Korenstein, B. Hess. *Nature* **270**, 184-186 (1977).
Hydration Effects on the Photocycle of Bacteriorhodopsin in Thin Layers of Purple Membrane.
84. E.P. Ippen, D.V. Shank, A. Lewis, M.A. Marcus. *Science* **200**, 1279-1281 (1978).
Subpicosecond Spectroscopy of Bacteriorhodopsin.
85. K.J. Kaufmann, V. Sundstrom, T. Yamane, P.M. Rentzepis. *Biophys. J.* **22**, 121-124 (1978).
Kinetics of the 580-nm Ultrafast Bacteriorhodopsin Transient.
86. U. Dinur, B. Honig, M. Ottolenghi. *Photochem. Photobiol.* **33**, 523-527 (1981).
Analysis of Primary Photochemical Processes in Bacteriorhodopsin.
87. H.-J. Polland, M.A. Franz, W. Zinth, W. Kaiser, E. Kölling, D. Oesterheld. *Biochim. Biophys. Acta* **767**, 635-639 (1984).
Optical Picosecond Studies of Bacteriorhodopsin Containing a Sterically Fixed Retinal.
88. M.C. Nuss, W. Zinth, W. Kaiser, E. Kölling, D. Oesterheld. *Biophys. Chem.* **22**, im Druck (1985).
Femtosecond Spectroscopy of the First Events of the Photochemical Cycle in Bacteriorhodopsin.
89. M.L. Applebury, K.S. Peters, P.M. Rentzepis. *Biophys. J.* **23**, 375-382 (1978).
Primary Intermediates in the Photochemical Cycle of Bacteriorhodopsin.

90. A. Lewis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 549-553 (1978).
The Molecular Mechanism of Excitation in Visual Transduction and Bacteriorhodopsin.
91. B. Honig. *Current Top. Membranes Transp.* **16**, 371-382 (1982).
Photochemical Charge Separation and Active Transport in the Purple Membrane.
92. B. Honig, T. Ebrey, R.H. Callender, U. Dinur, M. Ottolenghi. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 2503-2507 (1979).
Photoisomerization, Energy Storage, and Charge Separation: A Model for Light Energy Transduction in Visual Pigments and Bacteriorhodopsin.
93. D. Oesterhelt, B. Hess. *Eur. J. Biochem.* **37**, 316-326 (1973).
Reversible Photolysis of the Purple Complex in the Purple Membrane of *Halobacterium halobium*.
94. D.R. Ort, W.W. Parson. *Biophys. J.* **25**, 341-354 (1979).
The Quantum Yield of Flash-induced Proton Release by Bacteriorhodopsin-containing Membrane Fragments.
95. J.I. Korenbrot, S.-B. Hwang. *J. Gen. Physiol.* **76**, 649-682 (1980).
Proton Transport by Bacteriorhodopsin in Planar Membranes Assembled from Air-Water Interface Films.
96. R. Govindjee, T.G. Ebrey, A.R. Crofts. *Biophys. J.* **30**, 231-242 (1980).
The Quantum Efficiency of Proton Pumping by the Purple Membrane of *Halobacterium halobium*.
97. M. Renard, M. Delmelle. *Biophys. J.* **32**, 993-1006 (1980).
Quantum Efficiency of Light-driven Proton Extrusion in *Halobacterium halobium*. pH Dependence.
98. D. Kuschmitz, B. Hess. *Biochem.* **21**, 5950-5957 (1981).
On the Ratio of the Proton and Photochemical Cycles in Bacteriorhodopsin.
99. B. Becher, T.G. Ebrey. *Biophys. J.* **17**, 185-191 (1977).
The Quantum Efficiency for the Photochemical Conversion of the Purple Membrane Protein.
100. R.R. Birge, T.M. Cooper. *Biophys. J.* **42**, 61-69 (1983).
Energy Storage in the Primary Step of the Photocycle of Bacteriorhodopsin.
101. C.R. Goldschmidt, O. Kalisky, T. Rosenfeld, M. Ottolenghi. *Biophys. J.* **17**, 179-183 (1977).
The Quantum Efficiency of the Bacteriorhodopsin Photocycle.
102. J.B. Hurley, T.G. Ebrey. *Biophys. J.* **22**, 49-66 (1978).
Energy Transfer in the Purple Membrane of *Halobacterium halobium*.
103. W. Zinth, Techn. Univ. München, pers. Mitteilung

104. F.T. Hong, M. Montal. *Biophys. J.* **25**, 465-472 (1979).
Bacteriorhodopsin in Model Membranes. A New component of the Displacement Photocurrent in the Microsecond Time Scale.
105. P. Seta, P. Ormos, B. d'Epenoux, C. Gavach. *Biochim. Biophys. Acta* **591**, 37-52 (1980).
Photocurrent Response of Bacteriorhodopsin Adsorbed on Molecular Lipid Membranes.
106. L.A. Drachev, A.D. Kaulen, L.V. Khitrina, V.P. Skulachev. *Eur. J. Biochem.* **117**, 461-470 (1981).
Fast Stages of Photoelectric Processes in Biological Membranes. I. Bacteriorhodopsin.
107. A. Fahr, P. Luger, E. Bamberg. *J. Membrane Biol.* **60**, 51-62 (1981).
Photocurrent Kinetics of Purple-Membrane Sheets Bound to Planar Membranes.
108. L. Keszthelyi, P. Ormos, G. Varo. *Acta Phys. Acad. Sci. Hung.* **53**, 143-157 (1982).
Fast Components of the Electric Response Signal of Bacteriorhodopsin Protein.
109. P. Ormos, L. Reinisch, L. Keszthelyi. *Biochim. Biophys. Acta* **722**, 471-479 (1983).
Fast Electric Response Signals in the Bacteriorhodopsin Photocycle.
110. H.-W. Trissl. *Biochim. Biophys. Acta* **723**, 327-331 (1983).
Charge Displacements in Purple Membranes Adsorbed to a Heptane/Water Interface. Evidence for a Primary Charge Separation in Bacteriorhodopsin.
111. G. Varo, L. Keszthelyi. *Biophys. J.* **43**, 47-51 (1983).
Photoelectric Signals from Dried Oriented Purple Membranes of *Halobacterium halobium*.
112. A.K. Dyumaev, V.V. Savranski, G.V. Vasil'ev, R.R. Vladimirova, Z.A. Malina. *Biofizika* **29**, 389-393 (1984).
On the Kinetics of Occurrence of Photo-induced Potential Difference in a Model System Containing Bacteriorhodopsin.
113. G.I. Groma, G. Szabo, G. Varo. *Nature* **308**, 557-558 (1984).
Direct Measurement of Picosecond Charge Separation in Bacteriorhodopsin.
114. H.-W. Trissl. *Biochim. Biophys. Acta* **806**, 124-135 (1985).
Primary Electrogenic Processes in Bacteriorhodopsin Probed by Photoelectric Measurements with Capacitative Metal Electrodes.
115. P. Ormos, Z. Dancshazy, L. Keszthelyi. *Biophys. J.* **31**, 207-214 (1980).
Electric Response of a Back Photoreaction in the Bacteriorhodopsin Photocycle.
116. D.R. Ort, W.W. Parson. *Biophys. J.* **25**, 355-364 (1979).
Enthalpy Changes During the Photochemical Cycle of Bacteriorhodopsin.

117. H. Garty, D. Cahen, S.R. Caplan. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **97**, 200-206 (1980).
Photoacoustic Calorimetry of Halobacterium halobium Photocycle.
118. H. Garty, S.R. Caplan. *Biophys. J.* **37**, 405-415 (1982).
Photoacoustic Photocalorimetry and Spectroscopy of Halobacterium halobium Purple Membranes.
119. J. LeGrange, D. Cahen, S.R. Caplan. *Biophys. J.* **37**, 4-6 (1982).
Photoacoustic Calorimetry of Purple Membrane.
120. M. Renard, P. Thirion, M. Delmelle. *Biophys. J.* **44**, 211-218 (1983).
Photoacoustic Spectroscopy of Bacteriorhodopsin Photocycle.
121. D. Kalisky, M. Ottolenghi, B. Honig, R. Korenstein. *Biochem.* **20**, 649-655 (1981).
Environmental Effects on Formation and Photoreaction of the M412 Photoproduct of Bacteriorhodopsin: Implications for the Mechanism of Proton Pumping.
122. B. Hess, D. Kuschmitz. *FEBS Letters* **100**, 334-340 (1979).
Kinetic Interaction between Aromatic Residues and the Retinal Chromophore of Bacteriorhodopsin during the Photocycle.
123. J.M. Fukumoto, J.H. Hanamoto, M.A. El-Sayed. *Photochem. Photobiol.* **39**, 75-79 (1984).
On the Tyrosine Involvement in the Schiff Base Deprotonation in the Proton Pump Cycle of Bacteriorhodopsin.
124. J.H. Hanamoto, P. Dupuis, M.A. El-Sayed. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 7083-7087 (1984).
On the Protein(Tyrosine)-Chromophore(Protonated Schiff Base) Coupling in Bacteriorhodopsin.
125. K. J. Rothschild, M. Zagaeski, W.A. Cantore. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **103**, 483-489 (1981).
Conformational Changes of Bacteriorhodopsin Detected by Fourier Transform Infrared Difference Spectroscopy.
126. K. Bagley, G. Dollinger, L. Eisenstein, A.K. Singh, L. Zimanyi. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 4972-4976 (1982).
Fourier Transform Infrared Difference Spectroscopy of Bacteriorhodopsin and its Photoproducts.
127. K.J. Rothschild, H. Marrero. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 4045-4049 (1982).
Infrared Evidence that the Schiff Base of Bacteriorhodopsin is Protonated: bR570 and K Intermediates.
128. F. Siebert, W. Mäntele. *Eur. J. Biochem.* **130**, 565-573 (1983).
Investigation of the Primary Photochemistry of Bacteriorhodopsin by Low-Temperature Fourier-Transform Infrared Spectroscopy.

129. K.J. Rothschild, P. Roepe, J. Lugtenburg, J.A. Pardoén. *Biochem.* **23**, 6103-6109 (1984).
Fourier Transform Infrared Evidence for Schiff Base Alteration in the First Step of the Bacteriorhodopsin Photocycle.
130. M. Engelhard, K. Gerwert, B. Hess, F. Siebert. *Biochem.* **24**, 400-407 (1985).
Light-driven Protonation Changes of Internal Aspartic Acids of Bacteriorhodopsin: An Investigation by Static and Time-resolved Infrared Difference Spectroscopy using (4-¹³C) Aspartic Acid Labelled Purple Membrane.
131. F. Siebert, W. Mäntele, W. Kreutz. *Biophys. Struct. Mech.* **6**, 139-146 (1980).
Flash-induced Kinetic Infrared Spectroscopy Applied to Biochemical Systems.
132. F. Siebert, W. Mäntele, W. Kreutz. *FEBS Letters* **141**, 82-87 (1982).
Evidence for the Protonation of two Internal Carboxylic Groups During the Photocycle of Bacteriorhodopsin.
133. R.E. Cookingham, A. Lewis, A.T. Lemley. *Biochem.* **17**, 4699-4711 (1978).
A Vibrational Analysis of Rhodopsin and Bacteriorhodopsin Chromophore Analogues: Resonance Raman and Infrared Spectroscopy of Chemically Modified Retinals and Schiff Bases.
134. R. Cookingham, A. Lewis. *J. Mol. Biol.* **119**, 569-577 (1978).
Resonance Raman Spectroscopy of Chemically Modified Retinals: Assigning the Carbon-Methyl Vibrations in the Resonance Raman Spectrum of Rhodopsin.
135. B. Ehrenberg, A.T. Lemley, A. Lewis, M.v. Zastrow, H.L. Crespi. *Biochim. Biophys. Acta* **593**, 441-453 (1980).
Resonance Raman Spectroscopy of Chemically Modified and Isotopically Labelled Purple Membranes. I. A Critical Examination of the Carbon-Nitrogen Vibrational Modes.
136. M. Akhtar, L. Jallo, A.H. Johnson. *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* **1982**, 44-46 (1982).
Interaction of a conformationally Rigid Analogue of Retinal with Bacterio-opsin.
137. T. Iwasa, M. Takao, M. Yamada, K. Tsujimoto, F. Tokunaga. *Biochem.* **23**, 838-843 (1984).
Properties of an Analogue Pigment of Bacteriorhodopsin Synthesized with Naphtylretinal.
138. P. Umadevi, M. Sheves, V. Rosenbach, M. Ottolenghi. *Photochem. Photobiol.* **38**, 197-203 (1983).
Photochemical Studies of Artificial Bacteriorhodopsin.
139. H. Bayley, R. Ramakrishnan, K.-S. Huang, H.G. Khorana. *J. Biol. Chem.* **256**, 3797-3801 (1981).
Light-driven Proton Translocation by Bacteriorhodopsin Reconstituted with the Phenyl Analog of Retinal.

140. R.K. Crouch, Y.S. Dr, S. Ghent, C.-H. Chang, R. Govindjee, T.G. Ebrey, R.H. Callender, A. Pande. *J. Amer. Chem. Soc.* **106**, 8325-8327 (1984).
Neither the Retinal Ring nor the Ring Double Bond is Required for Proton Pumping in Bacteriorhodopsin: Acyclic Retinal Bacterioopsin Analogues.
141. M. Muradin-Szweykowska, J.A. Pardoën, D. Dobbelstein, L.J.P. van Amsterdam, J. Lugtenburg. *Eur. J. Biochem.* **140**, 173-176 (1984).
Bacteriorhodopsins with Chromophores Modified at the B-Ionone Site. Formation and Light-driven Action of the Proton Pump.
142. M. Muradin-Szweykowska, L.J.P. van Amsterdam, L.J.M. Rodenburg, J. Lugtenburg, R.L. van der Bend, K. van Dam. *FEBS Letters* **154**, 180-184 (1983).
BR Ret Ret-A Demethylretinal Konformation.
143. M. Sheves, N. Friedman, V. Rosenbach, M. Ottolenghi. *FEBS Letters* **166**, 245-247 (1984).
Preparation of (1,1,5,-tri-demethyl)bacteriorhodopsin Pigment and its Photocycle Study.
144. M. Sheves, T. Baasov, N. Friedman, M. Ottolenghi, R. Feinmann-Weinberg, V. Rosenbach, B. Ehrenberg. *J. Amer. Chem. Soc.* **106**, 2435-2437 (1984).
On the Binding Site of Bacteriorhodopsin. A Study with Artificial Pigments.
145. W. Gärtner, P. Towner, H. Hopf, D. Oesterhelt. *Biochem.* **22**, 26371-2644 (1983).
Removal of Methyl Groups from Retinal Controls the Activity of Bacteriorhodopsin.
146. M. Muradin-Szweykowska, A.D. Broek, J. Lugtenburg, R.L. van der Bend, P.W.M. van Dijk. *Rec. J. Royal Netherlands Chem. Soc.* **102**, 42-46 (1983).
Bacteriorhodopsins with a Chemically Modified Chromophore. The Ligh-driven Proton Pump Action of (13-Demethyl-11,14-epoxy)-, (9-Demethyl)-, (13-Demethyl)-, and (19,13-Bisdemethyl)-Bacteriorhodopsin.
147. M. Muradin-Szweykowska, A.J.M. Peters, J. Lugtenburg. *Recl. Trav. Chim. Pay-Bas* **103**, 105-109 (1984).
The Interaction of Bacterioopsin with 11,14-Bridged Retinals.
148. M. Sheves, N. Friedman, A. Albeck. *Biochem.* **24**, 1260-1265 (1985).
Primary Photochemical Event in Bacteriorhodopsin: Study with Artificial Pigments.
149. J.-M. Fang, J.D. Carriker, V. Balogh-Nair, K. Nakanishi. *J. Amer. Chem. Soc.* **105**, 5162-5164 (1983).
Evidence for the Necessity of Double Bond (13-Ene) Isomerization in the Proton Pumping of Bacteriorhodopsin.

150. F. Tokunaga, T.G. Ebrey, R. Crouch. *Photochem. Photobiol.* **33**, 495-499 (1981).
Purple Membrane Analogs Synthesized from C17 Aldehyde.
151. B. Mao, R. Govindjee, T.G. Ebrey, M. Arnaboldi, V. Balogh-Nair, K. Nakanishi, R. Crouch. *Biochem.* **20**, 428-435 (1981).
Photochemical and Functional Properties of Bacteriorhodopsins Formed from 5,6-Dihydro- and 5,6-Dihydrodesmethylretinals.
152. B. Honig, U. Dinur, K. Nakanishi, V. Balogh-Nair, M.A. Gainowicz, M. Arnaboldi, M.G. Motto. *J. Amer. Chem. Soc.* **101**, 7084-7086 (1979).
An External Point-Charge Model for Wavelength Regulation in Visual Pigments.
153. U.C. Fischer, D. Oesterhelt. *Biophys. J.* **31**, 139-146 (1980).
Changes in the Protonation State of Bacterio-Opsin during Reconstitution of Bacteriorhodopsin.
154. T. Schreckenbach, B. Walckhoff, D. Oesterhelt. *Biochem.* **17**, 5353-5359 (1978).
Specificity of the Retinal Binding Site of Bacteriorhodopsin: Chemical and Stereochemical Requirements for the Binding of Retinol and Retinal.
155. U. Fischer, D. Oesterhelt. *Biophys. J.* **28**, 211-230, (1979).
Chromophore Equilibria in Bacteriorhodopsin.
156. M.E. Edgerton, T.A. Moore, C. Greenwood. *Biochem. J.* **189**, 413-420 (1980).
Investigations into the Effect of Acid on the Spectral and Kinetic Properties of Purple Membrane from *Halobacterium halobium*.
157. T. Yoshihara, H. Suzuki, A. Maeda. *Photochem. Photobiol.* **33**, 501-510 (1981).
Theory of the Optical Absorption of Light-adapted Bacteriorhodopsin and its Acidified Forms.
158. E. Hrabeta, A.E. Robinson, L. Packer. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **122**, 1110-1116 (1984).
Effect of Specific Carboxyl Modifications on the Blue Acid Species and O650 Photocycle Intermediates of Bacteriorhodopsin.
159. S.D. Smith, R.A. Mathies. *Biophys. J.* **47**, 251-254 (1985).
Resonance Raman Spectra of the Acidified and Deionized Forms of Bacteriorhodopsin.
160. A. Maeda, T. Iwasa, T. Yoshizawa. *Biochem.* **19**, 3825-3831 (1980).
Formation of 9-cis and 11-cis-Retinal Pigments from Bacteriorhodopsin by Irradiating Purple Membrane in Acid.
161. U.C. Fischer, P. Towner, D. Oesterhelt. *Photochem. Photobiol.* **33**, 529-537 (1981).
Light Induced Isomerisation, at Acidic pH, Initiates Hydrolysis of Bacteriorhodopsin to Bacterio-Opsin and 9-cis-Retinal.

162. S. Druckmann, M. Ottolenghi, A. Pande, J. Pande, R.H. Callender. *Biochem.* **21**, 4953-4959 (1982).
Acid-Base Equilibrium of the Schiff Base in Bacteriorhodopsin.
163. J.J.H.M. De Pont, F.J.M. Daemer, S.L. Bonting. *Arch. Biochem. Biophys.* **140**, 267-274 (1970).
Biochemical Aspects of the Visual Process. VII. Equilibrium Conditions in the Formation of Retinylidene Imines.
164. C. Morris, D. Barron, P. Rogers. *Proc. Aust. Biochem. Soc.* **12**, 84 (1979).
Chemical Modification of Bacteriorhodopsin.
165. J.P. Hardy, A.E.W. Knight, K.P. Ghiggino, T.A. Smith, P.J. Rogers. *Photochem. Photobiol.* **39**, 81-88 (1984).
Effects of Tryptophan Oxidation on Bacteriorhodopsin Structure and Function.
166. T. Konishi, L. Packer. *FEBS Letters* **79**, 369-373 (1977).
Chemical Modification of Bacteriorhodopsin with N-Bromosuccinimide.
167. L. Packer, A.T. Quintanilha, C. Carmeli, P.D. Sullivan, P. Scherrer, S. Tristram, J. Herz, A. Pfeifhofer, R.J. Mehlhorn. *Photochem. Photobiol.* **33**, 579-585 (1981).
Molecular Aspects of Light-induced Uptake and Release of Protons by Purple Membranes.
168. S. Tu, D. Shiuan, F. Ramirez, B. McKeever. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **99**, 584-590 (1981).
Effects of Fluorescamine Modification on Light-induced H⁺-Movement in Reconstituted Purple Membrane of Halobacteria.
169. Y. Takeuchi, K. Ohno, M. Yoshida, K. Nagano. *Photochem. Photobiol.* **33**, 587-529 (1981).
Light-induced Proton Dissociation and Association in Bacteriorhodopsin.
170. J.M. Herz, L. Packer. *FEBS Letters* **131**, 158-164 (1981).
Structural Involvement of Carboxyl Residues in the Photocycle of Bacteriorhodopsin.
171. L. Packer, S. Tristram, J.M. Herz, C. Russell, C.L. Borders. *FEBS Letters* **108**, 243-248 (1979).
Chemical Modification of Purple Membranes: Role of Arginine and Carboxylic Acid Residues in Bacteriorhodopsin.
172. Yu.A. Ovchinnikov, N.G. Abdulaev, A.E. Dergachev, A.L. Drachev, L.A. Drachev, A.D. Kaulen, L.V. Khitrina, Z.P. Lazarova, V.P. Skulachev. *Eur. J. Biochem.* **127**, 325-332 (1982).
Photoelectric and Spectral Responses of Bacteriorhodopsin Modified by Carbodiimide and Amine Derivatives.
173. R. Renthal, B. Wallace. *Biochim. Biophys. Acta* **592**, 621-625 (1980).
Carbodiimides Inhibit the Acid-induced Purple-to-Blue Transition of Bacteriorhodopsin.

174. P. Scherrer, L. Packer, S. Seltzer. *Arch. Biochem. Biophys.* **212**, 589-601, (1981).
Effect of Iodination of the Purple Membrane on the Photocycle of Bacteriorhodopsin.
175. G. Gogel, A. Lewis. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **103**, 175-181 (1981).
Effect of Iodination on the pK of Schiff Base Deprotonation and M412 Production in Purple Membrane.
176. H.-D. Lemke, D. Oesterhelt. *Eur. J. Biochem.* **115**, 595-604 (1981).
The Role of Tyrosine Residues in the Function of Bacteriorhodopsin. Specific Nitration of Tyrosine 26.
177. V. Rosenbach, R. Goldberg, C. Gilon, M. Ottolenghi. *Photochem. Photobiol.* **36**, 197-201 (1982).
On the Role of Tyrosine in the Photocycle of Bacteriorhodopsin.
178. E. Lam, S. Seltzer, T. Katsura, L. Packer. *Arch. Biochem. Biophys.* **227**, 321-328 (1983).
Light-Dependent Nitration of Bacteriorhodopsin.
179. H.-D. Lemke, J. Bergmeyer, J. Straub, D. Oesterhelt. *J. Biol. Chem.* **257**, 9384-9388 (1982).
Reversible Inhibition of the Proton Pump Bacteriorhodopsin by Modification of Tyrosine 64.
180. J. Simons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 3375-3376 (1977).
An Observation Concerning Electronically Excited Retinal.
181. D.S. Johnston, A.D. Clark, C.M. Kemp, D. Chapman. *Biochim. Biophys. Acta* **679**, 400-403 (1982).
An Evaluation of the Charge-transfer Model for the Chromophores of the Retinal-containing Proteins, Rhodopsin and Bacteriorhodopsin.
182. B. Brzezinski, Universität Posen, pers. Mitteilung.
183. K. Schulten. *S.R. Caplan & M. Ginzburg (eds.) Energetics and Structure of Halophilic Microorganisms*, Elsevier/North-Holland, 331-334 (1978).
An Isomerization Model for the Photocycle of Bacteriorhodopsin.
184. K. Schulten, P. Tavan. *Nature* **272**, 85-86 (1978).
A Mechanism for the Light-Driven Proton Pump of Halobacterium halobium.
185. G. Orlandi, K. Schulten. *Chem. Phys. Letters* **64**, 370-374 (1979).
Coupling of Stereochemistry and Proton Donor-Acceptor Properties of a Schiff Base. A Model of a Light-driven Proton Pump.
186. P. Tavan, K. Schulten, D. Oesterhelt. *Biophys. J.* **47**, 415-430 (1985).
The Effect of Protonation and Electrical Interactions on the Stereochemistry of Retinal Schiff Bases.

187. R. Mathies, L. Stryer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**, 2169-2173 (1976).
Retinal has a Highly Dipolar Vertically Excited Singlet State: Implications for Vision.
188. S. Seltzer, S. Ehrenson. *Photochem. Photobiol.* **39**, 207-211 (1984).
The Purple Membrane Proton Pump: a Mechanistic Proposal for the Source of the Second Proton.
189. A. Warshel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 2558-2562 (1978).
Charge Stabilization Mechanism in the Visual and Purple Membrane Pigments.
190. A. Warshel. *Photochem. Photobiol.* **30**, 285-290 (1979).
Conversion of Light Energy to Electrostatic Energy in the Proton Pump of *Halobacterium halobium*.
191. B. Honig, T. Ebrey, R.H. Callender, U. Dinur, M. Ottolenghi. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 2503-2507 (1979).
Photoisomerization, Energy Storage, and Charge Separation: A Model for Light Energy Transduction in Visual Pigments and Bacteriorhodopsin.
192. B. Honig. *Current Top. Membranes Transp.* **16**, 371-382 (1982).
Photochemical Charge Separation and Active Transport in the Purple Membrane.
193. J.F. Nagle, H.J. Morowitz. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 298-302 (1978).
Molecular Mechanisms for Proton Transport in Membranes.
194. H.J. Morowitz. *Amer. J. Physiol.* **235**, R99-R114 (1978).
Proton Semiconductors and Energy Transduction in Biological Systems.
195. J.F. Nagle, M. Mille, H.J. Morowitz. *J. Chem. Phys.* **72**, 3959-3971 (1980).
Theory of Hydrogen Bonded Chains in Bioenergetics.
196. E.-W. Knapp, K. Schulten, Z. Schulten. *Chem. Phys.* **46**, 215-229 (1980).
Proton Conduction in Linear Hydrogen-Bonded Systems.
197. J.F. Nagle, M. Mille. *J. Chem. Phys.* **74**, 1367-1372 (1981).
Molecular Models of Proton Pumps.
198. J.F. Nagle, S. Tristram-Nagle. *J. Membrane Biol.* **74**, 1-14 (1983).
Hydrogen Bonded Chain Mechanisms for Proton Conduction and Proton Pumping.
199. P. Schuster, P. Wolschann, K. Tortschanoff. *I. Pecht & R. Rigler (eds.) Chemical Relaxation in Molecular Biology*, Springer, 107-190 (1977).
Dynamics of Proton Transfer in Solution.
200. U. Böhner. *OH...O-Wasserstoffbrücken in Oxobase-Carbonsäure- oder -Sulfonsäuresystemen. Eine infrarotspektroskopische Untersuchung*, Diss., München (1983).

201. E.G. Weidemann, G. Zundel. *Z. Naturforsch.* **25a**, 627-634 (1970).
Field-dependent Mechanism of Anomalous Proton Conductivity and the Polarizability of Hydrogen Bonds with Tunneling Protons.
202. G. Zundel. *Allg. Prakt. Chemie* **21**, 329-338 (1970).
Wasserstoff-Brücken mit Tunnelproton - anomale Protonenleitfähigkeit - Infrarot-Kontinuum und Protonendispersionskräfte.
203. R. Janoschek, E.G. Weidemann, G. Zundel. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. II* **69**, 505-520 (1973).
Calculated Frequencies and Intensities Associated with Coupling of the Proton Motion with the Hydrogen Bond Stretching Vibration in a Double Minimum Potential Surface.
204. A. Hayd, E.G. Weidemann, G. Zundel. *J. Chem. Phys.* **70**, 86-91 (1979).
Theory of IR Continua with Polarizable Hydrogen Bonds. I. Aqueous Solutions of Strong Acids.
205. R. Lindemann, G. Zundel. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. II* **73**, 788-803 (1976).
Polarizability, Proton Transfer and Symmetry of Energy Surfaces of Carboxylic Acid-N-Base Hydrogen Bonds. Infra Red Investigations.
206. T. Zeegers-Huyskens, P. Huyskens. *H. Ratajczak & W.J. Orville-Thomas (eds.) Molecular Interaction*, Vol. 2, Wiley, 1-106 (1980).
Proton Transfer and Ion Transfer Complexes.
207. G. Albrecht, G. Zundel. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. I* **80**, 553-561 (1984).
Phenol-Amine Hydrogen Bonds with Large Proton Polarizabilities.
208. F. Hund. *Z. Physik* **43**, 805-826 (1927).
Zur Deutung der Molekelspektren. III. Bemerkungen über das Schwingungs- und Rotationsspektrum bei Molekeln mit mehr als zwei Kernen.
209. A. Brzic, A. Karpfen, H. Lischka, P. Schuster. *Chem. Phys.* **89**, 337-343 (1984).
A Candidate for an Ion Pair in the Vapor Phase: Proton Transfer in Complexes R3N.HX.
210. G. Zundel, J. Fritsch. *J. Phys. Chem.* **88**, 6295-6302 (1984).
Environmental Interaction of Hydrogen Bonds Showing a Large Proton Polarizability. Molecular Processes and the Thermodynamics of Acid Dissociation.
211. R. Krämer. *Bestimmung der thermodynamischen Daten von Wasserstoffbrückenbindungen in unterschiedlichen Lösungsmitteln*, Diplomarbeit, München (1984).
212. J.H. Miller, H.M. Sobell. *J. Mol. Biol.* **24**, 345-350 (1967).
Infrared Demonstration of Hydrogen Bonding between Purine and Pyrimidine Base Analogues.

213. G. Zundel, P. Schuster et al. (eds.) *The Hydrogen Bond. Recent Developments in Theory and Experiment*, North Holland, 687-766 (1976). Easily Polarizable Hydrogen Bonds - their Interactions with the Environment - IR Continuum and Anomalous Large Proton Conductivity.
214. L.J. Bellamy. *The Infra-Red Spectra of Complex Molecules*, Chapman & Hall, London (1975).
215. R. Herbeck, G. Zundel. *Biochim. Biophys. Acta* **418**, 52-62 (1976). Influence of Temperature and Magnesium Ions on the Secondary and Tertiary Structures of tRNA(Phe) and 23S RNA - Infrared Investigations.
216. K. Kölkenbeck, G. Zundel. *Biophys. Struct. Mech.* **1**, 203-219 (1975). The Significance of the 2'OH Group and the Influence of Cations on the Secondary Structure of the RNA Backbone.
217. A. Novak. *Structure and Bonding* **18**, 177-216 (1974). Hydrogen Bonding in Solids. Correlation of Spectroscopic and Crystallographic Data.
218. B. Brzezinski, G. Zundel. *J. Mol. Structure* **72**, 9-15 (1981). Intramolecular Easily Polarizable Charged and Non-charged Hydrogen Bonds: IR Continua and Hydrogen Bond Length.
219. M. Leuchs, G. Zundel. *Can. J. Chem.* **60**, 2118-2131 (1982). Formation of Acid-Water Hydrogen Bonds with Large Proton Polarizability and Molecular Processes with Dissociation of Acids in the pKa Range 0-4.
220. G. Albrecht, G. Zundel. *Z. Naturforsch.* **39a**, 986-992 (1984). Carboxylic Acid-N Base Hydrogen Bonds with Large Proton Polarizability in Acetonitrile as a Function of the Basicity of the Hydrogen Bond Acceptors.
221. H. Engelhardt, N. Riehl. *Phys. kondens. Materie* **5**, 73-82 (1966). Zur protonischen Leitfähigkeit von Eis-Einkristallen bei tiefen Temperaturen und hohen Feldstärken.
222. J. Fritsch, G. Zundel, A. Hayd, M. Maurer. *Chem. Phys. Letters* **107**, 65-69 (1984). Proton Polarizability of Hydrogen-bonded Chains: An ab initio SCF Calculation with a Model Related to the Conducting System in Bacteriorhodopsin.
223. U. Burget. *Wasserstoffbrückenbindungen zwischen polaren Proteinseitengruppen und Phosphaten. Eine infrarotspektroskopische Untersuchung an Modellsystemen*, Diss., München (1985).
224. D.M. Blow, J.J. Birktoft, B.S. Hartley. *Nature* **221**, 337-340 (1969). Role of a Buried Acid Group in the Mechanism of Action of Chymotrypsin.

225. F.M.L.G. Stamato, E. Longo, L.M. Yoshioka. *J. Theor. Biol.* **107**, 329-338 (1984).
The Catalytic Mechanism of Serine Proteases: Single Proton versus Double Proton Transfer.
226. R. Lindemann, G. Zundel. *Biopolymers* **16**, 2407-2418 (1977).
Proton Transfer and Polarizability of Hydrogen Bonds in Proteins Coupled with Conformational Changes. I. Infrared Investigation of Poly(Glutamic Acid) with Various N Bases.
227. R. Lindemann, G. Zundel. *Biopolymers* **17**, 1285-1304 (1978).
Proton Transfer and Polarizability of Hydrogen Bonds Coupled with Conformational Changes in Proteins. II. IR Investigation of Polyhistidine with Various Carboxylic Acids.
228. P.P. Rastogi, W. Kristof, G. Zundel. *Int. J. Biol. Macromol.* **3**, 154-158 (1981).
Easily Polarizable Proton Transfer Hydrogen Bonds between the Side Chains of Histidine and the Carboxylic Acid Groups of Glutamic and Aspartic Acid Residues in Proteins.
229. D. Schiöberg, G. Zundel. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. II* **69**, 771-781 (1972).
Very Polarisable Hydrogen Bonds in Solutions of Bases Having Infra-red Absorption Continua.
230. M. Hennecke, B.V. Plapp. *Biochem.* **22**, 3721-3728 (1983).
Involvement of Histidine Residues in the Activity of Horse Liver Alcohol Dehydrogenase.
231. M.W. Makinen, W. Maret, M.B. Yim. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 2584-2588 (1983).
Neutral Metal-bound Water is the Base Catalyst in Liver Alcohol Dehydrogenase.
232. W. Kristof, G. Zundel. *Biophys. Struct. Mech.* **6**, 209-225 (1980).
Proton Transfer in and Polarizability of Hydrogen Bonds in Proteins. Tyrosine-Lysine and Glutamic Acid-Lysine Hydrogen Bonds - IR Investigations.
233. W. Kristof, G. Zundel. *Biopolymers* **19**, 1753-1769 (1980).
Structurally Symmetrical, Easily Polarizable Hydrogen Bonds between Side Chains in Proteins and Proton-conducting Mechanisms. III.
234. P.P. Rastogi, G. Zundel. *Z. Naturforsch.* **36c**, 961-963 (1981).
Aspartic Acid-Aspartate and Glutamic Acid-Glutamate Hydrogen Bonds Having Great Proton Polarizability - IR Investigations.
235. G. Zundel, H. Merz, U. Burget. *S. Papa et al. (eds.) H⁺-ATPase (ATP Synthase): Structure - Function - Biogenesis. The F₀ F₁ Complex of Coupling Membranes*, Adriatica Editrice, Bari, 285-294 (1984).
Proton Polarizability of Hydrogen Bonds and Proton Conduction and Activation in Biological Membranes.

236. P.P. Rastogi, G. Zundel. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **99**, 804-812 (1981).
Proton Translocation in Hydrogen Bonds with Large Proton Polarizability Formed between a Schiff Base and Phenols.
237. H. Merz, G. Zundel. *Chem. Phys. Letters* **95**, 529-532 (1983).
Proton-transfer Equilibria in Phenol-Carboxylate Hydrogen Bonds. Implications for the Mechanism of Light-induced Proton Activation in Bacteriorhodopsin.
238. U. Tangermann. *Bestimmung thermodynamischer Daten von Wasserstoffbrücken zwischen Acetat und substituierten Phenolen anhand infrarotspektroskopischer Methoden*, Diplomarbeit, München (1984).
239. V.L. Khristoforov, E.N. Zvonkova, R.P. Evstigneeva. *J. Gen. Chem. USSR* **44**, 876-879 (1977).
Nature of the Link of the Chromophore with the Protein in Rhodopsin. Hydrogen Bond in the System N-all-trans-Retinylidene-Butylamine p-Cresol CCl₄.
240. J. Drahonovsky, Z. Vacek. *Coll. Czech. Chem. Commun.* **36**, 3431-3440 (1971).
Dissociation Constants and Column Chromatography of Chlorinated Phenols.
241. E.P. Serjeant, B. Dempsey. *Ionisation Constants of Organic Acids in Aqueous Solution*, IUPAC Data Series No. 23, Pergamon Press (1978).
242. J. Fritsch. *Umgebungseinflüsse auf leicht polarisierbare Wasserstoffbrücken*, Diss., München (1980).
243. G. Albrecht. *Aufreihung von Protonendonoren und -akzeptoren nach ihrer relativen Stärke anhand von infrarotspektroskopisch bestimmten Symmetrieeigenschaften von Wasserstoffbrücken*, Diss., München (1982).
244. A. Kawada, A.R. McGhie, M.M. Labes. *J. Chem. Phys.* **52**, 3121-3125 (1970).
Protonic Conductivity in Imidazole Single Crystal.
245. C. Kayalar. *J. Membrane Biol.* **45**, 37-42 (1979).
A Model for Proton Translocation in Biomembranes Based on Keto-Enol Shifts in Hydrogen Bonded Peptide Groups.
246. S. Krimm, A.M. Dwivedi. *Science* **216**, 407-408 (1982).
Infrared Spectrum of the Purple Membrane: Clue to a Proton Conduction Mechanism?.
247. G. Zaccai, D.J. Gilmore. *J. Mol. Biol.* **132**, 181-191 (1979).
Areas of Hydration in the Purple Membrane of Halobacterium halobium: A Neutron Diffraction Study.
248. P.K. Rogan, G. Zaccai. *J. Mol. Biol.* **145**, 281-283 (1981).
Hydration in Purple Membrane as a Function of Relative Humidity.

249. Yu.A. Lazarev, E.L. Terpugov. *Biochim. Biophys. Acta* **590**, 324-338 (1980).
Effect of Water on the Structure of Bacteriorhodopsin and Photochemical Processes in Purple Membranes.
250. G. Varo, L. Keszthelyi. *Biophys. J.* **47**, 243-246 (1985).
Arrhenius Parameters of the Bacteriorhodopsin Photocycle in Dried Oriented Samples.
251. B.J. Plotkin, W.V. Sherman. *Biochem.* **23**, 5353-5360 (1984).
Spectral Heterogeneity in Protein Fluorescence of Bacteriorhodopsin: Evidence for Intraprotein Aqueous Regions.
252. A.K. Dunker, D.J. Zaleske. *Biochem. J.* **163**, 45-57 (1977).
Stereochemical Considerations for Constructing alpha-Helical Protein Bundles with Particular Application to Membrane Proteins.
253. H. Ruppel, Techn. Univ. Berlin, persönliche Mitteilung
254. A.R. Fersht, J.-P. Shi, J. Knill-Jones, D.M. Lowe, A.J. Wilkinson, D.M. Blow, P. Brick, P. Carter, M.M.Y. Waye, G. Winter. *Nature* **314**, 235-238 (1985).
Hydrogen Bonding and Biological Specificity Analysed by Protein Engineering.

Lebenslauf

Name: Helmut Walter Merz

Geburtsdatum: 1. August 1956

Geburtsort: München

Staatsangehörigkeit: deutsch

Eltern: Walter Merz und Frau Eva,
geb. Dorfmeister

Familienstand: verheiratet

Schule: 1962 - 1966 Volksschule am Schererplatz,
München-Pasing
1966 - 1975 Max-Planck-Gymnasium,
München-Pasing

Hochschule: 1975 - 1981 Studium der Chemie an der
Universität München
1981 Diplom
1981 - 1985 Anfertigung der Dissertation
bei Prof. Zundel am Phys.-Chem. Inst.
der Universität München

Beruf: 1981 - 1983 wissenschaftlicher
Mitarbeiter (DFG)
seit 1. 4. 1983 vollb. wiss. Hilfskraft an
der Universität München

